



Mariana Bedin

Medica Veterinária

Utilização de Bactérias do Ácido Láctico como Culturas Protectoras em Enchidos Fermentados Portugueses

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Maria João Fraqueza
Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade De Lisboa
Co-Orientador: Professora Doutora Benilde Mendes
Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova De Lisboa

SETEMBRO 2014



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Mariana Bedin

Medica Veterinária

Utilização de Bactérias do Ácido Láctico como Culturas Protectoras em Enchidos Fermentados Portugêses

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Maria João Fraqueza
Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade De Lisboa
Co-Orientador: Professora Doutora Benilde Mendes
Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova De Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Lúcia Durão Leitão – FCT/UNL
Arguente: Prof. Doutor Luís Avelino Patarata - UTAD
Vogal: Prof. Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza – FMV/UL

Copyright

Copyright © - Todos os direitos reservados. Mariana Bedin.
Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova
de Lisboa.

“Utilização de Bactérias do Ácido Lático como Culturas
Protectoras em Enchidos Fermentados Portugueses”

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgá-la através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

Este trabalho foi subsidiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projeto “Portuguese traditional meat products: strategies to improve safety and quality” (PTDC/AGRALI/119075/2010).

AGRADECIMENTOS

Em especial ao meu pai, Adair, pelo incentivo e oportunidade não poderia ter crescido tanto sem ele.

À minha mãe, Liliam, por toda a força e carinho durante essa caminhada.

Ao Thiago, sem mais.

À minha família e agregados por todo suporte.

Aos familiares e amigos que vieram me trazer um pouquinho do meu mundinho, que vieram saciar um pedaço da minha saudade.

Aos meus antigos amigos, que sempre acreditaram em mim e me deram forças mesmo a grandes distâncias. Aos meus novos amigos, por toda as fases boas e ruins, por me ensinarem coisas novas e por sempre rirem das minhas piadas. Levarei sempre todos no meu coração! ** Sandra, Clenira, Ana Q., Ângelo, Liliana, Michele, Guhs, Ana M., Beatriz, Cynthia, Marina, César, Mônica **

Às pessoas com quem aprendi muito, Prof. Dr^a. Maria João por todos os ensinamentos, por toda a paciência, tempo e atenção dedicado à mim neste último ano, Zézinha e Lena por todas as horas de esclarecimento de duvidas e ajuda no laboratório, também pelas horas sagradas do café!

Aos amigos do Gabinete 99, Hail Science, não teria tirado as mais ridículas dúvidas e me divertido tantas imensas horas.

À Dra. Andreia Laukova do Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Laboratory of Animal Microbiology, Slovakia, que gentilmente cedeu a estirpe sensível a bacteriocinas *Enterococcus avium* (EA5).

À Fundação para a Ciência e Tecnologia por subsidiar este trabalho através do projeto "Portuguese traditional meat products: strategies to improve safety and quality" (PTDC/AGRALI/119075/2010).

Esta tese é dedicada à minha amiga Renata. Sem você não estaria aqui, não teria aprendido tanto. E é para você que termino um sonho que começamos juntas, minha baixinha.

<< Parece-me estar a vê-lo [o *Satanás*] chegar ao campo, com a *Gula* sobre o ventre: é a sua couraça; a *Preguiça* serve-lhe de esporas; à cinta traz a *Luxúria*, que é um estoque perigoso; a Inveja é a sua adaga; traz o *Orgulho* na cabeça, como o guarda traz o seu elmo; no bolso tem a *Avareza*, para dela se servir conforme as necessidades; quanto à *Cólera*, com as injúrias e tudo o que se lhes segue, esconde-a na boca, o que lhes mostra que vem armado até os dentes.
>>

La Chronique du temps de Charles IX

Prosper Mérimée (1829)

RESUMO

As bactérias do ácido láctico (BAL) são conhecidas pela sua utilização em produtos cárneos fermentados, contribuindo para o desenvolvimento de características sensoriais e melhoria da sua segurança, através de mecanismos naturais com inibição de bactérias deteriorativas e patogénicas. Esta capacidade é chamada de biopreservação, onde a microbiota natural ou a adicionada é usada para aumentar o tempo de prateleira do produto e a sua segurança. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de biopreservação de três estirpes de *Lactobacillus*, previamente isoladas de produtos cárneos fermentados, sendo caracterizado o seu potencial bacteriocinogénico contra diversos microrganismos patogénicos e deteriorativos que podem ser encontrados em produtos cárneos. Duas estirpes foram selecionadas para serem avaliadas em ensaios de antagonismo contra *L. innocua*, tendo sido inoculadas em massa tradicional de chouriço e em carne sem condimentações, com mimetização de suas fases de fabrico a 7 °C e 20 °C. Nesses ensaios a evolução da microbiota deteriorativa e tecnológica foi estudada assim como a capacidade de inibir *Listeria* sp. de forma a seleccionar as estirpes mais adequadas a participar em culturas protectoras. Face às diferentes condições de estudos pode-se concluir que as três estirpes testadas apresentaram potencial bacteriogénico para com a microbiota deteriorativa e patogénica. Dentre as duas estirpes testadas nos ensaios *in vitro*, a estirpe *L. plantarum* P3B7 apresentou resultados inibitórios de aeróbios totais a 30 °C e *Listeria innocua* mais desejáveis em ambos os ensaios.

Palavras-chave: Biopreservação. *Lactobacilli*. Cultura protectora. Enchidos fermentados. Segurança Alimentar.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are known for their extended use in fermented foods, contributing to the development of sensory characteristics and its safety, through natural mechanisms such the inhibition of pathogenic and spoilage microbiota. This mechanism is usually referred as a term called biopreservation, where the natural or added microbiota is used to extend the shelf-life and enhance food product safety. The objective of this assay was to evaluate the biopreservation ability of three *Lactobacillus* strains, previously isolated from fermented meat products, evaluating its bacteriocinogenic potential against several pathogenic and spoilage strains that can be found in fermented meat products. Two strains were selected to be evaluated in an *in vitro* antagonism assays against *L. innocua*, using traditional fermented meat sausage matrix and a meat matrix without seasonings, and simulating two different phases of production at 7 °C and 20 °C. The evolution of the spoilage and technological was observed as well as inhibition capability of *Listeria* spp. leading to a selection of strains to include in starter cultures. Considering the different conditions of this essay it can be concluded that all three tested strains demonstrated bacteriocinogenic potential towards spoilage and pathogenic strains. Between the two selected strains on the *in vitro* assay, *L. plantarum* P3B7 showed more desirable results on the inhibition of total aerobes at 30 °C and *Listeria innocua*.

Key-words: Biopreservation. *Lactobacilli*. Protective culture. Fermented meat sausages. Food Safety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 6.1 – Diagrama do procedimento para a avaliação bacterocinogénica dos isolados.	29
Figura 6.2 – Esquema em imagem para ensaios. O pH foi medido apenas nas amostras em que não foram inoculadas <i>L. innocua</i>	31
Figura 7.1 – Halos de inibição dos microrganismos deteriorativos e tecnológicos testados.	40
Figura 7.2 – Halos de inibição dos microrganismos patogénicos testados.	40
Figura 7.3 – Halos de inibição das estirpes de <i>L. innocua</i> de referência e <i>L. monocytogenes</i> de referência e selvagens.	41
Figura 7.4 – Gel de agarose, produtos obtidos da utilização do PCR específico para <i>L. monocytogenes</i>	45
Figura 7.5 – Efeitos das diferentes condições de inoculação numa matriz cánea sem condimentações armazenada em dois estágios de temperatura ao longo do tempo (horas) nos parâmetros microbiológicos analisados (\log^{10} UFC g ⁻¹).	47
Figura 7.6 – Efeitos das diferentes condições de inoculação numa matriz cánea sem condimentações armazenada em dois estágios de temperatura ao longo do tempo (horas) nos parâmetros microbiológicos analisados (\log^{10} UFC g ⁻¹).	49
Figura 7.7 – Efeitos das diferentes condições de inoculação numa matriz cánea sem condimentações armazenada em dois estágios de temperatura ao longo do tempo (horas) para a contagem de <i>Listeria</i> sp. (\log^{10} UFC g ⁻¹).	51
Figura 7.8 – Efeitos das diferentes condições de inoculação numa matriz de massa de chouriço armazenada em dois estágios de temperatura ao longo do tempo (horas) nos parâmetros microbiológicos analisados (\log^{10} UFC g ⁻¹).	53
Figura 7.9 – Efeitos das diferentes condições de inoculação numa matriz de massa de chouriço armazenada em dois estágios de temperatura ao longo do tempo (horas) nos parâmetros microbiológicos analisados (\log^{10} UFC g ⁻¹).	55
Figura 7.10 – Efeitos das diferentes condições de inoculação numa matriz de massa de chouriço armazenada em dois estágios de temperatura ao longo do tempo (horas) na contagem de <i>Listeria</i> sp. (\log^{10} UFC g ⁻¹).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Ficha técnica do produto Chouriço. Adaptado de: Ahn & Min, 2007; Andrés <i>et al.</i> 2007; Decreto-Lei nº 560/99, Fraqueza <i>et al.</i> , 2007; Petäjä-Kanninen & Puolanne, 2007; Quinta Da Portela, 2012; Vignolo <i>et al.</i> , 2010.....	7
Tabela 4.1 – Famílias e Géneros pertencentes ao Filo <i>Firmicutes</i> , Classe <i>Bacilli</i> , Ordem <i>Lactobacillales</i> . Adaptado de: Ludwig <i>et al.</i> , 2009a; Hammes & Hertel, 2009.	12
Tabela 4.2 – Propriedades de microrganismos utilizados em culturas <i>starters</i> . Adaptado de: Ammor & Mayo, 2006; Beck, 2005; Jay, 2000; Vignolo <i>et al.</i> , 2010.....	13
Tabela 4.3 – Espécies de <i>Lactobacillus</i> produtores de D(-)/L(+)-ácido láctico. Fonte: Connolly & Lonnerdal, 2004.	14
Tabela 4.4 – Algumas das principais propriedades desejáveis e indesejáveis de culturas <i>starters</i> . Fonte: Adaptado de Ammor & Mayo, 2007; Leroy <i>et al.</i> , 2006.....	17
Tabela 4.5 – Microrganismos patogénicos encontrados em enchidos cárneos fermentados. Fonte: Ray, 2000.	19
Tabela 4.6 – Requisitos para o crescimento dos principais perigos biológicos de enchidos fermentados e medidas de controlo. Fonte: Adaptado de: Feiner, 2006; De Vos <i>et al.</i> , 2009; Ray, 2000; Silva, 2003; USDA, 1999.....	21
Tabela 6.1 – Origem e identificação das estirpes de <i>Lactobacillus</i> utilizadas.....	27
Tabela 6.2 – Origem e identificação dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> selvagens utilizados....	27
Tabela 6.3 – Reagentes utilizados na determinação da composição em L(+) e D(-) ácido láctico. Adaptado de: Kit D-/L-Latic acid, UV method Nzytech, Portugal.....	30
Tabela 6.4 – Formulação da massa de chouriço.	32
Tabela 6.5 – Desenho do ensaio de competição/antagonismo com as condições de inoculação	33
Tabela 6.6 – Condições da reacção PCR para identificação de <i>Listeria monocytogenes</i> . Fonte: Adaptado de Talon <i>et al.</i> , 2007a; Simon <i>et al.</i> , 1996.	37
Tabela 7.1 – Resultados da quantificação da produção de L(+) e D(-) ácido láctico.	43
Tabela 7.2 – Parâmetros analisados na matéria prima apresentados em log ¹⁰ UFC g ⁻¹	44
Tabela 7.3 – Valores do pH para as amostras de massa de carne não condimentada.	52
Tabela 7.4 – Valores do pH para as amostras de massa formulada de chouriço.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	-	Porcentagem
°C	-	Graus Celsius
µg	-	Micrograma
µL	-	Microlitro
ADP	-	Trifosfato de adenosina
ALOA	-	Agar Listeria de Ottaviani & Agosti
ANOVA	-	Análise de variância
AT	-	Aeróbios totais
ATCC	-	<i>American Type Culture Collection</i>
Aw	-	Actividade aquosa
BAL	-	Bactérias ácido lácticas
BHI	-	<i>Brain Heart Infusion</i>
CCUG	-	Culture Collection, University of Göteborg
CECT	-	Spanish Type Culture Collection
COS	-	Columbia agar suplementado sangue
DO	-	Densidade óptica
DSMZ	-	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>)
dv	-	Desvio Padrão
EUA	-	Estados Unidos da América
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i> (EUA)
g	-	Gramas
GRAS	-	<i>General Reconized as Safe</i>
HACCP	-	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i>
IAP	-	Institute of Animal Physiology
ICMSF	-	<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i>
ISO	-	<i>International Organization for Standardization</i>
kDA	-	Kilo Daltons
L	-	Litros
LAM	-	Laboratory of Animal Microbiology
Log	-	Logaritmo
mg	-	Miligramas
mL	-	Mililitros
MRS	-	Man Rogosa & Sharp
MSA	-	Mannitol Salt Agar
nm	-	Nanômetro
PCR	-	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PFGE	-	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
pH	-	Potencial hidrogeniônico
QPS	-	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
SAS	-	Slovak Academy of Sciences
Sig.	-	Significância
SNC	-	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
TGA	-	Tryptose Glucose Extract Agar
TSA	-	Tryptona Soja Agar
UFC	-	Unidade formadora de colônia
USDA	-	<i>United States Department of Agriculture</i>
VRDB	-	Violet Red Bile Dextrose
w/v	-	Massa / Volume

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
ÍNDICE GERAL	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. ENCHIDOS CÁRNEOS FERMENTADOS.....	3
2.1 Ingredientes e processo de fabrico de enchidos cárneos fermentados	4
3. MICROBIOTA DE PRODUTOS CÁRNEOS	9
4. BIOCONSERVAÇÃO: MELHORIA DE SEGURANÇA DOS ALIMENTOS E AUMENTO DO PERÍODO DE VIDA	11
4.1 Microbiota tecnológica: bactérias do ácido láctico.....	11
4.1.1 Propriedades desejáveis de culturas <i>starters</i>	16
4.1.1.1 Potencial bacteriocinogénico: produção de bacteriocinas.....	17
4.1.2 Propriedades indesejáveis de culturas <i>starters</i>	18
4.1.2.1 Produção de peróxido de hidrogénio.....	18
4.1.2.2 Produção de gás (carbóxilo de hidrogénio - carboidrato).....	18
4.1.2.3 Aminas biogénicas.....	19
4.2 Microbiota deteriorativa e patogénica presente em produtos cárneos.....	19
4.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	21
5. UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO COMO CULTURAS PROTECTORAS EM ENCHIDOS FERMENTADOS PORTUGUESES.....	25
5.1 Objectivos e justificação.....	25
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
6.1 Origem dos isolados de <i>Lactobacillus</i> em estudo.....	27
6.1.1 Origem das estirpes de <i>Lactobacillus</i> em estudo.....	27
6.1.2 Origem de isolados selvagens de <i>Listeria monocytogenes</i>	27
6.1.3 Estirpes de referência utilizadas nos ensaios de avaliação do potencial bacteriocinogénico, caracterização da produção de ácido láctico e no ensaio de antagonismo/competição.....	27
6.1.4 Condições de conservação, preparação e cultura dos isolados em estudo	28
6.2 Caracterização da capacidade inibitória das estirpes <i>Lactobacillus</i> em estudo.....	28
6.2.1 Avaliação do potencial bacteriocinogénico	28
6.2.2 Determinação da produção de L(+) e D(-) ácido láctico	30
6.3 Ensaios de competição/antagonismo <i>in vitro</i>	31
6.3.1 Caracterização da matéria prima utilizada nos ensaios <i>in vitro</i>	31
6.3.2 Preparação e produção da massa de chouriço	32
6.3.3 Preparação das suspensões de <i>Lactobacillus</i> e de <i>Listeria innocua</i> para inoculação	32
6.3.4 Preparação das amostras do ensaio <i>in vitro</i>	33
6.3.5 Inoculação das amostras	33
6.3.6 Análise microbiológica	34
6.3.6.1 Preparação e diluição das amostras	34
6.3.6.2 Contagem de microrganismos aeróbios totais (AT) a 30°C	34
6.3.6.3 Contagem de Bactérias do Ácido Láctico (BAL)	34
6.3.6.4 Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	34
6.3.6.5 Contagem de <i>Pseudomonas</i>	35
6.3.6.6 Contagem de <i>Staphylococcus coagulase negativo</i> (SCN).....	35
6.3.6.7 Contagem de <i>Listeria</i> sp.	35
6.4 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	35
6.4.1 Identificação de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR.....	36
6.4.2 Extração de DNA pelo método de guanidina.....	36
6.4.3 Método de identificação de <i>L. monocytogenes</i> por PCR	37
6.4.4 Condições de eletroforese para os produtos PCR amplificados	37
6.5 Determinação do pH	37
6.6 Análise estatística	37
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
7.1 Caracterização da capacidade inibitória dos isolados de <i>Lactobacillus</i> em estudo.....	39

7.1.1	Avaliação do potencial bacteriocinogénico	39
7.1.2	Determinação da produção de L(+) e D(-) ácido láctico	43
7.2	Ensaio de competição/antagonismo <i>in vitro</i>	44
7.2.1	Caracterização da matéria prima utilizada nos ensaios <i>in vitro</i>	44
7.2.2	Evolução da microbiota em massa de carne sem condimentação inoculada com <i>Lactobacillus</i>	46
7.2.3	Evolução da microbiota na massa de chouriço inoculada com <i>Lactobacillus</i>	52
7.2.4	Discussão integrada dos resultados	58
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	REFERÊNCIAS.....	69
	APÊNDICE A – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO POTENCIAL BACTERIOGÉNICO.....	79
	APÊNDICE B – IMAGENS DAS PLACAS DO MÉTODO ADAPTADO DE SKALKA (1986) PARA A AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BACTERIOGÉNICO DAS ESTIRPES DE LACTOBACILLUS TESTADAS.....	81
	APÊNDICE C – RESULTADOS DO ENSAIO UTILIZANDO CARNE SEM CONDIMENTAÇÕES.....	83
	APÊNDICE D – RESULTADOS DO ENSAIO UTILIZANDO MASSA CONDIMENTADA DE CHOURIÇO.....	85
	APÊNDICE E – CÁLCULO DOS DIFERENCIAIS DE CRESCIMENTO OBTIDOS PARA CADA PARÂMETRO E TAXA DE CRESCIMENTO CALCULADA PARA CADA PARÂMETRO.	87

1. INTRODUÇÃO

A procura de alimentos seguros, que não recorram à adição excessiva de conservantes químicos, aumentou de forma acentuada nos últimos anos. Assistiu-se então ao desenvolvimento de novos produtos e o conceito de biopreservação aplicado aos alimentos adquiriu uma grande importância tanto para as indústrias como para os consumidores (Kröckel, 2013; Stiles, 1996). Presentemente, os consumidores possuem um maior acesso a informação sobre a sua alimentação, procurando alimentos mais adequados às suas necessidades e muitas vezes optando por aqueles que além de seguros são considerados benéficos para a saúde.

Os produtos cárneos fermentados são consumidos amplamente pela população europeia. A extensa variedade de produtos à base de carne presentes no continente europeu pode ser diferenciada de acordo com o tipo de matéria prima utilizada (tipo de carne e de outros ingredientes cárneos), com a adição de temperos e especiarias e com o procedimento de fabrico, seja o enchido fermentado, curado ou fumado, cada qual característico de culturas e hábitos diferenciados de cada país e região. A sua produção consiste na actuação de uma microbiota fermentadora específica que confere características organolépticas a cada produto.

A aplicação de culturas bacterianas nos processos de produção de alimentos ocorre há muitos anos, a sua utilização em escala industrial permite um maior controlo da qualidade, seja em relação ao tempo de fabrico dos produtos ou pela padronização dos mesmos (sabor, cor, aroma, etc), certificando que as características finais dos produtos sejam homogéneas em todos os lotes de fabrico (Bernardi & Contreras-Castillo, 2010; Zeuthen, 2007).

A denominação de biopreservação surgiu a fim de diferenciar os alimentos que utilizam aditivos químicos para promover a sua conservação dos que recorrem a técnicas de conservação naturais (Kröckel, 2013; Stiles, 1996). Na elaboração de produtos cárneos fermentados pode-se ou não realizar a adição de culturas *starters* ou de arranque (Zeuthen, 2007). Estas culturas consistem em grupos já conhecido de microrganismos, os quais serão os principais responsáveis pelo processo de fermentação dos produtos.

O conhecimento do modo de actuação destes microrganismos em diferentes substratos, como em produtos cárneos, é de extremo interesse industrial uma vez que participam não apenas na origem de características organolépticas do produto, mas também na sua segurança, contribuindo para o controlo o desenvolvimento de microrganismos deteriorativos e patogénicos.

Em comparação a outros sectores da indústria alimentar, a utilização de tecnologia de ponta no sector de produtos cárneos fermentados pode ser considerado recente. Hutkins (2006) descreve que a utilização de novas tecnologias para o desenvolvimento de produtos cárneos fermentados teve início apenas no século XX (Hutkins, 2006). Segundo Jay (2000), apenas no início dos anos 1900 foram descobertos os benefícios da adição de microrganismos na produção de produtos fermentados e a partir daí iniciou-se a inoculação de culturas bacterianas para a produção de enchidos fermentados (Jay, 2000). O desenvolvimento destas

tecnologias está relacionado com o controlo de microrganismos e suas estirpes, i.e., culturas *starters* ou de arranque, e só esteve disponível a partir de 1960 (Hammes & Hertel, 1998; Hutkins, 2006; Jay, 2000; Leroy & Vuyst, 2005).

Este estudo tem como objetivo avaliar a capacidade de biopreservação caracterizando o potencial bacteriocinogénico de três estirpes de *Lactobacillus*, dois *L. plantarum* (P05-15 e P3B7) e um *L. sakei* (CV3C2) previamente isoladas de produtos cárneos, contra microrganismos deteriorativos, tecnológicos e patogénicos habitualmente presentes na microbiota de produtos cárneos fermentados, seleccionando os mais adequados para conferirem bioprotecção a alimentos, como por exemplo integrando uma cultura *starter* para produtos cárneos fermentados.

Estes microrganismos serão primeiramente avaliados quanto à sua capacidade bacteriocinogénica através do método adaptado de Skalka e colaboradores (1983) e Skalka (1986) contra microrganismos deteriorativos (*Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas aeruginosa*), tecnológicos (*Staphylococcus equorum* e *S. xylosus*) e patogénicos (*E. Coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella enteridis* e *S. aureus*) (Skalka *et al.*, 1983; Skalka, 1986). O teste foi também realizado contra o indicador *Enterococcus avium* (EA5), Serão posteriormente seleccionadas duas estirpes para a realização de ensaios *in vitro*, utilizando massa formulada de chouriço e também carne sem condimentações, para a avaliação da inibição contra *L. innocua*, utilizada como uma espécie não patogénica do género *Listeria* (Jay, 2005). Para o ensaio *in vitro* de antagonismo, as estirpes seleccionadas serão inoculadas de modo único ou em combinação em massa tradicional de chouriço e em carne sem condimentações sendo submetidas a condições que mimetizam as do fabrico de enchidos cárneos fermentados. Serão realizadas contagens diárias da microbiota ácido láctica e de *Listeria* sp., para a avaliação do poder de inibição dos *Lactobacillus* inoculados contra a *L. innocua*. Também serão realizadas contagens de microrganismos naturalmente presentes na microbiota da carne e do produto cárneo como: microrganismos aeróbios totais a 30 °C (AT), *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, bactérias ácido lácticas e *Staphylococcus*. Os resultados serão avaliados visando propriedades de biopreservação, de forma que estes microrganismos sejam classificados como aptos ou não aptos para a integração de uma cultura *starter* para produtos cárneos fermentados.

Este trabalho está estruturado primeiramente com uma revisão bibliográfica que visa englobar informações relevantes sobre enchidos cárneos fermentados caracterizando sua constituição, etapas e técnicas de fabrico, também abordando a constituição da microbiota destes produtos, tanto deteriorativa quanto patogénica. Será também referenciado a importância de microrganismos constituintes de culturas *starters* e suas principais características, focando na utilização de bactérias do género *Lactobacillus* como uma fermenta de biopreservação desejável para a integração de culturas *starters* e desenvolvimentos de produtos cárneos fermentados. Os ensaios realizados, tanto para a caracterização inicial das estirpes, como para o ensaio *in vitro*, assim como os resultados obtidos, a discussão e análise destes dados estão descritos nos capítulos finais deste projeto.

2. ENCHIDOS CÁRNEOS FERMENTADOS

Diferentes métodos de conservação surgiram a partir da necessidade de armazenar alimento. Em tempos de escassez um melhor aproveitamento, valorização e conservação da carcaça de um animal, suas vísceras e pequenos restos de carnes utilizadas na confecção de novos alimentos eram considerados importante para a sobrevivência da população.

A utilização de métodos para a conservação de alimentos já decorre há milhares de anos. Vignolo e colaboradores (2010) relataram descrições de técnicas de fermentação e secagem de produtos cárneos há mais de 2500 anos na China, podendo-se dizer que estes métodos de conservação são alguns dos mais antigos (Vignolo *et al.*, 2010). Zeuthen (2007) relatou que açougueiros romanos utilizavam carnes de vaca e de suíno cortadas em pequenos pedaços, misturadas com sal e especiarias, que eram acondicionadas em tripas limpas de animais e levadas a salas especiais para fumagem, demonstrando que naquela época já havia conhecimento sobre este processo de fabrico e conservação de alimentos (Zeuthen, 2007).

Pela necessidade de se prolongar a vida útil de alimentos desenvolveu-se e aprimoraram-se técnicas em que microrganismos eram utilizados não apenas para o desenvolvimento de características organolépticas mas também para garantia da qualidade dos alimentos.

Podem ser considerados enchidos cárneos fermentados aqueles produtos que através da actuação de bactérias ácido lácticas (BAL), adicionadas sob a forma de culturas *starters* ou presentes na matéria prima ou no ambiente fabril, passem pelo processo de fermentação láctica (respiração anaeróbia).

A correta origem da utilização de procedimentos como a secagem, fumagem e a fermentação de produtos cárneos não é certa, mas sabe-se que estes processos tiveram um papel fundamental não apenas para a melhoria da viabilidade destes alimentos, uma vez que aumentavam a sua estabilidade à temperatura ambiente, mas também para o aprimoramento da qualidade sensorial do produto (Jay, 2000). Com o passar dos anos estas técnicas foram aperfeiçoadas até ao momento em que novos produtos começaram a ser criados, dando origem a uma vasta gama de produtos cárneos que se conhece nos dias de hoje.

A fermentação e a maturação dos produtos cárneos ocorre pela actuação da microbiota presente no preparado cárneo inicial, em especial as BAL, *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), bolores e leveduras que auxiliam não apenas na conservação, mas também contribuem para as características organolépticas específicas (Vignolo *et al.*, 2010; Zeuthen, 2007).

Para que o processo de fermentação ocorra, uma prática comum consiste na adição de uma porção de uma massa de produto fermentado misturada na massa de carne que dará origem a novos produtos fermentados, esta prática é conhecida como *backslopping* (Jay, 2000). A microbiota, que já se encontrava estabelecida na massa fermentada é adicionada para que ocorra colonização da nova massa cárnea garantindo assim a perpetuação das características organolépticas dos produtos cárneos. Primeiramente a contaminação natural da matéria prima era suficiente para que o produto cárneo final desenvolvesse características

únicas e ao mesmo tempo fornecesse um produto relativamente seguro para o consumidor. A fermentação do produto ocorria de forma espontânea, sem a adição de microrganismos ou a utilização do conceito de *backslopping*.

Quando os conceitos de uso de culturas *starters* ou mesmo o *backslopping* não são utilizados o produto depende estritamente da contaminação microbiana sofrida durante a sua obtenção para passar pelo processo de fermentação. Esta contaminação tem o seu início no abate dos animais e aumenta gradualmente durante o decorrer do seu processamento. A contaminação pode ser proveniente dos utensílios usados no abate dos animais e no corte das carcaças, do tracto gastrointestinal dos animais abatidos, do ambiente fabril e armazenagem, mas também das mãos de manipuladores (Jay, 2000; Talon *et al.*, 2007b; Zeuthen, 2007).

Atualmente a utilização de culturas *starters* é efectuada tanto a nível tradicional quanto a nível industrial, o fácil acesso e o vasto conhecimento sobre os microrganismos utilizados permite que estas culturas tenham uma grande importância no mercado.

2.1 Ingredientes e processo de fabrico de enchidos cárneos fermentados

A escolha dos ingredientes para o fabrico de produtos cárneos fermentados pode depender de alguns factores como a disponibilidade do tipo de carne, factores culturais e de preferências, contudo a escolha da matéria prima também é feita pensando no produto final, uma vez que a qualidade microbiológica e química da matéria prima tem grande relação com as características finais do produto.

O ingrediente principal é a carne utilizando-se pedaços de carne magra e gordura. Juntamente com a carne são utilizados ingredientes como o sal, água, pimentão, alho, vinho, agentes de cura (nitritos e nitratos), açúcar e/ou dextrose, assim como fumo líquido, proteínas de origem animal ou vegetal, entre outros diversos temperos (Ammo & Mayo, 2007; Heinz & Hautzinger, 2007; Lebert *et al.*, 2007a; Norma Portuguesa 589:2008).

A utilização da matéria prima (carne) com um teor microbiano baixo é imprescindível, uma vez que uma elevada contaminação pode interferir diretamente com o processo de maturação do produto, prevenindo-se assim também sabores e texturas indesejadas e garantindo a segurança do alimento (Vignolo *et al.*, 2010).

A carne, limpa de porções exageradas de gordura e de tecido nervoso, é utilizada numa proporção de 80:20 (carne magra: gordura) na grande maioria dos produtos industriais, sendo esta relação variável em produtos tradicionais (Heinz & Hautzinger, 2007; Lebert *et al.*, 2007a). A ampla utilização de gordura rija de suíno para um produto de maior qualidade dá-se pelo fato de que este tipo de gordura apresenta uma maior estabilidade à rancificação nas etapas de maturação do produto, além de apresentar uma consistência mais firme e seca (Heinz & Hautzinger, 2007). A gordura utilizada deve possuir um ponto de fusão alto, isto é, não amolecer a baixas temperaturas, também deve possuir uma baixa percentagem de ácidos gordos polinsaturados para prevenir a rancificação (Vignolo *et al.*, 2010).

São largamente utilizadas as denominadas misturas de cura, isto é, misturas contendo ingredientes necessários para o desenvolvimento do sabor no produto. Podem incluir glucose,

como substrato para a fermentação, e nitratos/nitritos como estabilizadores da cor, entre outros ingredientes. O ácido ascórbico ou eritorbato de sódio também são utilizados (Jay, 2000). O ácido ascórbico é utilizado devido suas propriedades redutoras, acelerando a reacção entre agentes de cura, como o nitrito, e a mioglobina (Heinz & Hautzinger, 2007).

Dentre os condimentos que fazem parte das misturas de cura, o sal auxilia na solubilização e difusão de proteínas miofibrilares, criando uma ligação entre partículas de carne e gordura, para além de participar intensamente no *flavour* do produto (Työppönen *et al.*, 2003). Outros temperos têm forte contribuição no sabor, no aroma e na aparência do produto. Alguns podem também auxiliar na digestão como a salvia e o alecrim. Outros possuem propriedades bacteriostáticas como o alho. No entanto a acção bacteriostática destes temperos é apenas relevante na presença de elevadas concentrações dos mesmos, uma vez que são utilizados em baixas concentrações os resultados não poderem ser considerados satisfatórios para as condições de segurança do produto (Feiner, 2006). Os temperos também podem constituir fontes de agentes patogénicos como *Salmonella* spp., *E. coli* e *Listeria* spp. e devem receber, durante a sua selecção e compra, toda a atenção quanto à sua qualidade (Feiner, 2006).

A adição de açúcares é comum em enchidos fermentados. Açúcares simples como a glucose fornecem energia de fácil conversão para BAL, a sua quantidade influencia a taxa e duração da acidificação do meio (Ockerman & Basu, 2007).

O nitrato não contribui diretamente para a coloração do produto mas a sua redução a nitrito está relacionada à coloração rósea em produtos cárneos cozidos e vermelha em produtos cárneos curados. A utilização apenas de nitrato no fabrico de enchidos depende da presença de bactérias que reduzem o nitrato a nitrito como, por exemplo, *Micrococcaceae* e SCN, que possam estar presentes na microbiota do produto ou serem adicionados à mistura (Jay, 2000; Papamanoli *et al.*, 2002; Feiner, 2006). Espírito Santo e colaboradores (2005) observaram que concentrações elevadas de NaCl podem ter um efeito negativo no crescimento de *L. sakei* assim como também no decréscimo do pH, uma vez que reduzem a actividade de água (A_w) desfavorecendo o meio para o crescimento de bactérias lácticas (Espírito Santo *et al.*, 2005).

A obtenção do produto final ocorre então em duas fases, a de maturação e a de fermentação/secagem (Lebert *et al.*, 2007a). As fases de fermentação e maturação podem ter uma duração variada de acordo com o tipo do enchido. Estas fases são específicas para cada tipo de produto e também correspondem a um fator essencial para as características de textura e *flavour*. Como por exemplo, em enchidos de calibres próximos dos 6 cm, como os italianos do tipo *Milano* e *Crespone* e o *Salchicón* espanhol podem ter uma maturação de até 60 dias, enchidos poloneses do tipo *Krakowska sucha* até 3 semanas e em enchidos portugueses como o chouriço tradicional de 3 a 5 dias (Toldrá *et al.*, 2007).

Após o corte da carne e a mistura homogénea juntamente aos condimentos, forma-se uma massa consistente, facilitando o posterior enchimento dos invólucros. Antes do acondicionamento nos invólucros a massa passa por uma fase de maturação.

Os revestimentos dos produtos cárneos fermentados auxiliam na manutenção de um ambiente adequado para que ocorra o processo de fermentação. Para o chouriço de carne tradicional os invólucros utilizados são apenas de origem natural (tripas naturais) (Norma Portuguesa 589:2008).

Nos primeiros dias de maturação a água presente no produto tende a ficar mais próxima da superfície e então evapora (Jay, 2000), reduzindo a A_w final do produto. Durante a maturação também ocorrem processos como a proteólise e a lipólise (Petäjä-Kannine & Puolanne, 2007).

A humidade relativa durante a fase de fermentação é importante para determinar o valor de A_w final do produto, na fermentação os valores mínimos giram em torno de 63 – 75 % e máximos de 86 – 95 %, já para a secagem os valores mínimos são de 64 – 69% e valores máximos de 70 – 85 %. Nos enchidos tradicionais portugueses os valores finais de A_w do produto são de aproximadamente 0,83 a 0,95 (Decreto-Lei nº 560/99; Lebert *et al.*, 2007a).

A nível industrial, o controlo da humidade relativa, da temperatura e da velocidade do ar são realizados nas câmaras de secagem para garantir uniformidade de lotes, em métodos de processamento mais tradicionais muitas das vezes estes controlos não são feitos. Para enchidos secos fermentados os valores finais do pH pode variar entre 4,8 e 6,0 com uma percentagem de 0,5 a 1,0% de ácido láctico (Vignolo *et al.*, 2010).

A A_w em enchidos secos fermentados é aproximadamente de 0,85 a 0,91. Enquanto para enchidos fermentados semi-secos (chouriço) o pH final é em média de 4,7 a 5,2 – 5,4 com uma percentagem de ácido láctico de 0,5 a 1,3 % e o teor de humidade está entre 35% ou mais (Vignolo *et al.*, 2010), produtos que possuam maturação rápida possuem um pH em torno de 4,8 a 5,2 e um $A_w < 0,90$, em comparação com produtos de maturação mais lenta que possuem um pH em torno de 5,3 a 5,8 e um $A_w > 0,90$ (Fries, 2007). Em comparação a produtos secos, os enchidos fumados apresentam um A_w maior, entre $> 0,90 - 0,91$ (Vignolo *et al.*, 2010). Estes e outros parâmetros estão descritos na Tabela 2.1 – Ficha técnica do produto Chouriço.

Durante a fase de fumagem do produto pode-se utilizar diferentes técnicas, algumas das mais usadas são a fumagem natural e o fumo líquido (Feiner, 2006). A fumagem natural é realizada em câmaras de fumagem, onde ocorre a combustão controlada de madeira, às temperaturas de 300 a 600 °C, e um posterior decréscimo da temperatura (aproximadamente 85 °C) do fumo até chegar em contacto com o produto (Feiner, 2006; Vignolo *et al.*, 2010). O fumo líquido é resultante da condensação do fumo de madeiras seleccionadas e sobre condições controladas de pirólise, este pode então ser adicionado a massa cárnea por meio de atomização, gotejamento, pulverização na salmoura ou pela sua adição aos invólucros (Feiner, 2006).

Em comparação à fumagem natural, o fumo líquido apresenta algumas vantagens: a sua adição é padronizada e até mesmo a coloração do produto final é mais homogénea; não há emissão de fumo para a atmosfera podendo-se considerar ambientalmente correta; as

câmaras de produção do fumo são de fácil manutenção; é praticamente livre de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Feiner, 2006).

Tabela 2.1 – Ficha técnica do produto Chouriço. Adaptado de: Ahn & Min, 2007; Andrés *et al.* 2007; Decreto-Lei nº 560/99, Fraqueza *et al.*, 2007; Petäjä-Kanninen & Puolanne, 2007; Quinta Da Portela, 2012; Vignolo *et al.*, 2010.

Nome do produto:	Chouriço.
Especificação:	Enchido fumado feito á base de carne de suíno (pá) congelada, gordura congelada de suíno, cortada em fragmentos de dimensão superior a 1 cm, misturada com aditivos, condimentos e especiarias. A massa cárnea preparada passa então por um processo de maturação de 2 a 4 dias e então é acondicionada em invólucros naturais ou sintéticos. A fermentação ocorre durante 2 a 3 dias, variando de acordo com a especificidade do produto.
Características do produto:	Tamanho e peso: 40 cm x 3 cm, 270 g – 350 g. Formato e dimensões: Forma de ferradura individualizada por atadura com calibre compreendido entre 25 e 40 mm e até 50cm em comprimento linear. Características organolépticas: aspecto avermelhado e brilhante denotando uma coloração e cheiro resultantes do processo de fumagem por queima de madeiras apropriadas. Deve ter ainda consistência firme, invólucros sem roturas e bem aderente a massa. Interior (ao corte obliquo): massa perfeitamente ligada, de aspecto marmoreado com distribuição regular dos pedaços de carne e gordura de cor avermelhada e branca, com cheiro e sabor característicos. No caso específico do chouriço de carne tradicional a granulometria não deve ser inferior a 15 mm.
Composição do produto:Ingredientes	Chouriço Tradicional - Carne de suíno (70 – 80% de carne magra e 20 – 30% de gordura), Vinho, Água, Sal, Alho, Especiarias, Açúcares, Estabilizadores (E451 - Trifosfatos, E450 - Difosfatos), Proteína Vegetal, Lactose, Antioxidantes (E331- Citratos de sódio, E301 – Ascorbato de sódio), Dextrina, Leite em pó, Intensificador de Sabor (E621 – glutamato monossódico), Conservantes (E250 – Nitrito de sódio, E252 – Nitrito de potássio) e invólucro.
Acondicionamento:	Sem embalagem ou embalagem a vácuo ou atmosfera controlada, neste último caso deve estar especificado na embalagem o tipo de atmosfera utilizada (CO ₂ ou azoto).
Conservação:	Armazenar abaixo dos 15°C, em local fresco e seco sem incidência de luz.
Modo de utilização:	Pronto para consumo para indivíduos sem problemas de saúde. Consumo em quantidades moderadas para crianças e idosos. Atenção para grupos sensíveis que sofram de hipertensão, hipercolesterolemia e intolerância a lactose ou proteína de soja.
Prazo de validade:	Em embalagem a vácuo e atmosfera modificada 10 e 15°C o tempo de vida útil do produto é de 3 meses. Em embalagens a gás e em embalagens com temperaturas entre 0 e 6 °C o tempo de vida útil do produto é de 6 meses. Consumir preferencialmente antes da data de validade
Lote:	Onde; Ano de fabrico; Código interno do produto; Nº sequencial do fabrico.
Rotulagem:	Denominação de venda; A quantidade líquida; A data de durabilidade mínima ou a data limite de consumo; Nome ou firma ou denominação social e a morada do fabricante ou do embalador, ou de um vendedor estabelecido na União Europeia; Lista de ingredientes; Quantidade de determinados ingredientes ou categoria de ingredientes; Condições especiais de conservação; Modo de emprego ou de utilização quando a sua omissão não permitir fazer um uso adequado do género alimentício; O local de origem ou proveniência.
Comercialização:	Mercados, supermercados, talhos, restaurantes, comércio em geral.
Sugestão de consumo:	Pode-se consumir o produto cru, cozido ou assado.

A utilização de ingredientes com um alto grau de higiene e excelente qualidade é de extrema importância para que o processo de fermentação ocorra de maneira adequada. Estes dois parâmetros (higiene e qualidade) permitem uma maior homogeneidade sobre o processo de fermentação e maturação, uma vez que garantem um correto funcionamento dos mesmos, auxiliando no controlo da microbiota do produto e garantindo um produto final de qualidade e seguro para o consumo.

3. MICROBIOTA DE PRODUTOS CÁRNEOS

Os produtos cárneos fermentados, possuem diversas variações da sua microbiota. Estas variações não são apenas diferenciadas entre países, mas também a nível regional. Apesar de que alguns produtos possam apresentar uma mesma nomenclatura em diferentes países ou regiões, a sua microbiota pode ser diversificada.

Além da utilização de uma grande variedade de culturas *starters* no fabrico destes produtos, alguns dos factores que podem ser levados em consideração para a diferenciação da microbiota entre produtos cárneos fermentados são aqueles que envolvem: (a) a matéria prima utilizada, (b) o método de preparação e (c) o tempo de duração dos processos. Há que ter em consideração que para a obtenção do produto final se englobam outros factores inerentes ao processamento mais característicos e específicos de cada produto.

Em carnes frescas a variabilidade da microbiota dá-se devido a diversos factores, como por meio da contaminação com microrganismos da microbiota intestinal dos animais, pela própria alimentação do animal, através dos utensílios usados no processamento, por meio dos manipuladores e do ambiente fabril em si. Os utensílios e equipamentos usados antes do processamento devem ser convenientemente limpos e desinfectados, mas ainda assim podem ocorrer casos de contaminação, influenciando a disseminação de microrganismos sobre a matéria prima. A presença de microrganismos constituintes da microbiota intestinal de animais nunca é desejada, mas pode ocorrer caso boas práticas de higiene durante o processamento da carcaça não sejam devidamente implementadas.

Na microbiota de carnes frescas há uma predominância de bactérias Gram negativas, como as dos géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*. Em relação ao grupo de Gram positivas os *Enterococcus* e *Lactobacillus* são os mais encontrados (Jay, 2000; Saad & Franco, 1999).

Já em enchidos fermentados os microrganismos mais encontrados são primeiramente as BAL, seguidos por *Coccus* coagulase negativo (*Staphylococcus*), os quais constituem a segunda maior população na microbiota de produtos cárneos fermentados, normalmente apresentam teores de 6 a 8 log UFC/g em produtos processados a nível industrial (Lebert *et al.*, 2007a), destes, os mais frequentes são estirpes como *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* e *Kocuria* spp. (Ammo & Mayo, 2007; Cirolini *et al.*, 2009; Lebert *et al.*, 2007a; Vignolo *et al.*, 2010).

Alguns autores identificaram que dentre os *Lactobacillus*, as espécies *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum* e *L. bavaricus* são as espécies predominantes em toda a microbiota de enchidos (Drosinos *et al.*, 2005; Kongkiattikajorn, 2013; Lebert *et al.*, 2007a).

Espécies da família *Staphylococcaceae* auxiliam a fermentação do produto e são essenciais para a estabilidade da coloração do produto final, pois são capazes de realizar a redução de nitratos a nitritos e favorecer a formação de nitrosomioglobina. Permitindo transformação da mioglobina em oximioglobina e metamioglobina, este último reage com o óxido nítrico, que é adicionado no produto, permitindo a formação de nitrosometamioglobina

(coloração vermelha mais intensa) e nitrosomioglobina (carnes curadas sem ação do calor) (Reid & Fennema 2010; Jönck *et al.*, 2013; Mauriello *et al.*, 2003). Entretanto estes microrganismos não apresentam um bom crescimento em meios que contenham pH muito ácido, ao contrário de *Lactobacillus* (Lebert *et al.*, 2007a).

Dentre os *Staphylococcus*, as espécies *S. carnosus* e *S. xylosus* são os mais importantes para o setor industrial, pois fornecem características típicas ao produto e também são amplamente utilizados para a preparação de culturas *starters* (Beck, 2005; Lebert *et al.*, 2007a).

Microrganismos do gênero *Enterococcus* também podem ser encontrados em produtos cárneos fermentados, a sua alta tolerância a meios salinos e ampla faixa de crescimento em diferentes temperaturas permite que estes microrganismos se desenvolvam durante o processo de maturação do produto (Lebert *et al.*, 2007a).

Bolores e leveduras também estão presentes em enchidos cárneos, podendo contribuir para a qualidade final do produto no desenvolvimento de sabor e aromas, através de reações de lipólise, proteólise e da degradação de aminoácidos (Vignolo *et al.*, 2010). Os seus produtos celulares são grandes responsáveis pela produção de compostos voláteis que atuam no aprimoramento do aroma, são os metabolitos primários e secundários destes microrganismos e também lípases e proteinases que participam do processo de cura (Mauriello *et al.*, 2004; Leroy & Vuyst, 2005; Sunesen & Stahnke, 2003). São normalmente encontrados em valores próximos a 2,0 a 4,5 log UFC/g (Lebert *et al.*, 2007a) e durante o processo de maturação seus níveis não ultrapassaram 5 log UFC/g (Drosinos *et al.*, 2005).

4. BIOCONSERVAÇÃO: MELHORIA DE SEGURANÇA DOS ALIMENTOS E AUMENTO DO PERÍODO DE VIDA

A biopreservação em actuação conjunta com factores intrínsecos do alimento, como o pH, a temperatura e a A_w , conseguem estabelecer diferentes condições que proporcionam obstáculos para os microrganismos patogénicos e de deterioração tornando o alimento mais seguro mesmo sem a utilização de técnicas de conservação como atmosferas modificadas, tratamentos de alta pressão, conservantes químicos ou outros (Hugas, 1998).

A utilização de ferramentas bioprotectoras, como a aplicação de culturas *starters*, permite prolongar a vida útil dos alimentos, minimizando riscos higio-sanitários e garantir a segurança e qualidade do produto através do estudo e controlo do crescimento microbiano.

Um dos primeiros factores limitantes para o crescimento de microrganismos indesejáveis em enchidos cárneos é a adição de sal e outros condimentos que indisponibilizam a água do meio (Työppönen *et al.*, 2003).

A microbiota fermentadora no produto também auxilia no controlo da proliferação de microrganismos indesejáveis, tais como bolores, leveduras e de microrganismos patogénicos (Radulović *et al.*, 2011; Talon *et al.*, 2007b).

A biopreservação pode ser definida como o uso de microbiota competitiva para o controlo de microrganismos deteriorativos e patogénicos (Kröckel, 2013, Stiles, 1996). Lücke (2000) referiu que culturas bioprotectoras são culturas antagonistas que para além de inibirem patogénicos e aumentarem a vida útil, ainda participam nas propriedades organolépticas do produto (Lücke, 2000).

Alguns autores distinguem as culturas *starters* das culturas protetoras, baseados no facto das culturas *starters* serem mais específicas para desenvolver características organolépticas aos produtos finais enquanto as culturas bioprotectoras possuem acção específica contra agentes deteriorativos e patogénicos. Presentemente sabe-se que culturas *starters* agem como bioprotetoras e vice-versa (Kröckel, 2013).

Apesar da utilização de culturas *starters* fornecer um maior controlo sobre o desenvolvimento de microrganismos no produto, deve-se ressaltar que este tipo de tecnologia não substitui uma boa prática industrial, com condições higiénico-sanitárias adequadas e manipuladores com formação adequada, assim como a escolha de uma matéria prima adequada com baixa contaminação bacteriana e de boa qualidade e composição específica para cada produto (Kröckel, 2013).

4.1 Microbiota tecnológica: bactérias do ácido láctico

Os microrganismos de eleição para a produção de produtos cárneos fermentados consistem nas bactérias lácticas, este grupo envolve bactérias dos géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, este último muito utilizado na indústria de lacticínios (Jay, 2000; Stiles, 1996). Na Tabela 4.1, pode-se observar a classificação de família e género de algumas BAL.

Tabela 4.1 – Famílias e Gêneros pertencentes ao Filo *Firmicutes*, Classe *Bacilli*, Ordem *Lactobacillales*. Adaptado de: Ludwig *et al.*, 2009a; Hammes & Hertel, 2009.

Família	Gênero	Família	Gênero
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Paralactobacillus</i> <i>Pediococcus</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i> <i>Melissococcus</i> <i>Tetragenococcus</i> <i>Vagococcus</i>
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i> <i>Abiotrophia</i> <i>Dolosicoccus</i> <i>Eremococcus</i> <i>Facklamia</i> <i>Globicatella</i> <i>Ignavigranum</i>	<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
		<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Pactovum</i>
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i> <i>Alkalibacterium</i> <i>Allofustis</i> <i>Alloiococcus</i> <i>Atopobacter</i> <i>Atopococcus</i> <i>Atopostipes</i> <i>Desemzia</i> <i>Dolosigranulum</i> <i>Granulicatella</i> <i>Isobaculum</i> <i>Marinilactibacillus</i> <i>Trichococcus</i>		

Dentre os microrganismos utilizados para a produção de enchidos podemos citar as BAL, os cocos coagulase negativo e bolores e leveduras como os mais importantes. A utilização de diferentes grupos de bactérias é baseada nas propriedades benéficas que cada uma delas pode atribuir ao produto, algumas dessas propriedades específicas de cada microrganismo podem ser observadas na Tabela 4.2 – Propriedades de microrganismos utilizados em culturas *starters*.

Na Europa, os microrganismos mais utilizados para a produção de enchidos fermentados são *Lactobacillus sakei*, *L. plantarum* e *L. curvatus*, uma vez que constituem os principais organismos da microbiota natural da matéria prima utilizada. Estes são habitualmente selecionados para posterior utilização como cultura *starter*, sendo classificados como QPS (*qualified presumption of safety*) e GRAS (*general reconized as safe*) (Ammor & Mayo, 2006; Vignolo & Fadda, 2007). Já bactérias como o *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus* são microrganismos de eleição no EUA para culturas *starters* utilizadas em enchidos fermentados (Ammor & Mayo, 2006; Hugas, 1998).

O factor de sucesso para a utilização destas bactérias é a produção de ácido láctico, pois permitem que o pH seja reduzido (Bernardi & Contreras-Castillo, 2010), e associado à outros metabólitos bacterianos como catalases ou bacteriocinas tornam o ambiente inviável, inibindo a multiplicação de outros microrganismos e favorecendo o aumento do tempo de prateleira deste tipo de produtos carneos fermentados. Em carnes frescas, usadas como matéria prima, uma população microbiana de 10^2 a 10^3 UFC/g constituída basicamente por BAL desenvolve-se rapidamente no produto levando à sua acidificação como resultado da utilização da glicose (Vignolo *et al.*, 2010).

Tabela 4.2 – Propriedades de microrganismos utilizados em culturas *starters*. Adaptado de: Ammor & Mayo, 2006; Beck, 2005; Jay, 2000; Vignolo *et al.*, 2010.

Microrganismo	Atividade Metabólica	Benefícios durante a fermentação
Bactérias Láticas	Acidificação do meio	Sabor levemente ácido e picante; Inibição de patógenos e microrganismos deteriorativos; Textura; Aceleração do processo de secagem e formação de cor.
	Atividade proteolítica	Sabor (compostos não voláteis).
	Atividade antimicrobiana (bacteriocina)	Inibição de patógenos e microrganismos deteriorativos; Extensão do tempo de prateleira do produto.
	Potencial antioxidante	Estabilidade de coloração.
Cocos Coagulase Negativo	Atividade redutora de nitrato	Redução nos níveis de nitrato no produto; Coloração típica.
	Catabolismo de amino ácidos de cadeia ramificada e ácidos gordos	Compostos voláteis (aroma e <i>flavour</i>)
Bolores e Leveduras	Atividade antioxidante	Previne rancificação Estabilidade da coloração.
	Atividade proteolítica	Sabor

A redução do pH ocorre pela formação de diferentes compostos, principalmente o ácido láctico, que são produzidos dependentemente de factores genéticos e do meio. *Lactobacillus* são anaeróbios facultativos, isto é, crescem melhor em meios anaeróbios, mas também crescem em meios com pouco oxigénio contanto que sejam fornecidos carboidratos, produtos da proteólise e vitaminas (Papamanoli *et al.*, 2002). Em geral, *Lactobacillus* tem um crescimento ótimo em temperaturas mesófilas, no máximo até 40 °C. Alguns *Lactobacillus* termófilos podem crescer a temperaturas próximas ao 55 °C, mas não tem um bom crescimento abaixo dos 15 °C. Alguns *Lactobacillus* possuem características extremófilas, com crescimento em temperaturas acima dos 55 °C (Hammes & Hertel, 2009).

O processo de fermentação ocorre por interações físico-químicas entre ingredientes e a microbiota presente na massa, dando-se a transformação dos açúcares em ácido láctico pelas BAL para a obtenção de energia. A fermentação consiste na produção de ATP a partir do ADP, por fosforilação a nível de substrato, sem a utilização de oxigénio originando metabolitos como o lactato, o acetato, o etanol, entre outros (Jay, 2000). A fosforilação a nível de substrato é uma reação de alta energia onde o um grupo fosfato (PO₄) é ligado diretamente ao ADP (Nelson & Cox, 2004).

Esta rápida produção de energia dá-se de forma anaeróbia e tem como resultado a liberação de um ácido orgânico, o ácido láctico (Papamanoli *et al.*, 2002; Vignolo *et al.*, 2010), este ácido leva a uma subsequente redução do pH, lipólise, proteólise e também a formação de compostos aromáticos, estes factores favorecem a redução do A_w, levando a uma estabilização microbiológica e também à produção de compostos aromáticos característicos do produto (Hugas, 1998; Papamanoli *et al.*, 2002). Pela modificação do ambiente, as BAL iniciam um processo de seleção natural da microbiota inviabilizando alguns microrganismos e favorecendo a multiplicação de outros. Este processo é o responsável pelas características dos

enchidos fermentados, como o sabor picante, textura mais rija e fibrosa, quando comparado a outros produtos base de misturas cárneas (Jay, 2000). A acidificação do meio contribui especialmente para o sabor levemente ácido e picante (Barbut, 2007).

O ácido láctico é um agente acidificante, aromatizante, responsável pelo sabor específico de produtos fermentados e inibidor de uma larga variedade de agentes patogênicos e deteriorativos, que podem possuir maior ou menor sensibilidade aos diferentes isômeros do ácido láctico (Narayanan *et al.*, 2004). Este ácido é representado em dois isômeros, o D(-) ácido láctico e L(+) ácido láctico. A relação entre estes isômeros influencia suas diferentes aplicações, que podem variar da produção de alimentos à produção de polímeros biodegradáveis (Trontel *et al.*, 2011).

A produção de ambos os isômeros (L(+) e D(-) ácido láctico) é comum entre as BAL com caráter homofermentativas, como as pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (Trontel *et al.*, 2011). A produção do isômero L(+) está ligada a gêneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, enquanto o isômero D(-) é mais correlacionado com estirpes específicas do gênero *Lactobacillus* e algumas *Enterobacteriaceae* como *Eubacteria*, *Streptococcus bovis*, *Megasphaera elsdenii*, entre outros (Carr *et al.*, 2002; Connolly & Lonnerdal, 2004), como mostra a Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Espécies de *Lactobacillus* produtores de D(-)/L(+)-ácido láctico. Fonte: Connolly & Lonnerdal, 2004.

Produtores de D(-) ácido láctico	Produtores de L(+) ácido láctico	Produtores de DL- ácido láctico
<i>L.delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	<i>L. agilis</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i>	<i>L. amylophilus</i>	<i>L. amylovorus</i>
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>L. animalis</i>	<i>L. aviaris subsp. aviaries</i>
<i>L. jensenii</i>	<i>L. bavaricus</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. vitulinus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. mali</i>	<i>L. crispatus</i>
	<i>L. maltaromicus</i>	<i>L. curvatus</i>
	<i>L. murinus</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. paracasei subsp. paracasei</i>	<i>L. gasseri</i>
	<i>L. paracasei subsp. tolerans</i>	<i>L. hamsteri</i>
	<i>L. ruminis</i>	<i>L. helveticus</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. homohiochii</i>
	<i>L. sharpeae</i>	<i>L. pentosus</i>
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i>
		<i>L. reuteri</i>
		<i>L. sakei</i>

A produção acentuada de um ou de outro isômero depende de uma reação específica de lactato-desidrogenases NAD dependentes, a presença ou não destas enzimas é que dita qual dos isômeros será produzido (Connolly & Lonnerdal, 2004; Goffin *et al.*, 2005).

A produção de D(-) ácido láctico por algumas estirpes de *Lactobacillus* pode ser influenciada pela presença de uma enzima produzida pela própria bactéria, esta enzima induz a conversão de L(+) em D(-) ácido láctico, até que haja um equilíbrio entre estes isômeros (Narayan *et al.*, 2004).

A L-lactato desidrogenase, responsável pela redução do L(+) ácido láctico, uma enzima do metabolismo humano ao contrário da D-lactato desidrogenase (Connolly & Lonnerdal, 2004). A ingestão de D(-) ácido láctico é vastamente relacionada em literatura com casos de

acidose, mas a maioria destes casos estão ligados a indivíduos com síndrome do intestino curto ou recém nascidos com uma saúde debilitada (Dahlqvist *et al.*, 2013; Connolly & Lonnerdal, 2004). Após a ingestão, ambos os isómeros serão reduzidos no tracto gastrointestinal, servindo de substrato para outras bactérias naturais da microbiota humana, a redução D(-) ácido láctico é realizada por bactérias da microbiota intestinal que possuam D-lactato desidrogenase, ou por via de metabolitos da glucose (Connolly & Lonnerdal, 2004; Hino & Kuroda, 1993; Sena *et al.* 2008), o que torna a ingestão de ambos os produtos segura para a saúde humana.

A acidificação do meio também acelera o processo de maturação, trazendo o pH do meio próximo ao ponto isoelétrico das proteínas da carne (Barbut, 2007), facilitando a desnaturação de proteica e dificultando a ligação de moléculas de água, favorecendo o processo de secagem e a textura final do produto.

BAL podem ser classificadas quanto ao seu tipo de fermentação, essa classificação é dividida em três grupos: as homofermentativas obrigatórias, heterofermentativas obrigatórias e heterofermentativas facultativas. Bactérias homofermentativas obrigatórias realizam a fermentação de glucose via glicólise, gerando duas moléculas de ácido láctico e duas moléculas de ATP para cada molécula de açúcar (Corsetti & Settanni, 2007; Kang *et al.*, 2013). Bactérias heterofermentativa obrigatórias para além de ácido láctico ainda produzem CO₂, ácido acético e/ou etanol, dependendo da presença ou ausência de receptores de electrões. Esse processo de fermentação, conhecido como 6-fosfogluconato/fosfocetolase (6-PG/PK), é mais rápido comparado com a homofermentação, entretanto produz-se 50 % menos energia isto é, a partir de uma molécula de glucose produz-se uma molécula de ATP (Condon, 1987; Aarnikunnas, 2003; Kang *et al.*, 2013). Enquanto bactérias heterofermentativas facultativas podem utilizar ambas as vias (Aarnikunnas, 2003). Bactérias lácticas como *L. plantarum*, *L. sakei* e *L. curvatus* possuem caracter heterofermentativo facultativo (Hammes & Hertel, 2009).

Dentre os *Lactobacillus* as espécies *L. plantarum* e *L. sakei* são vastamente descritas em literatura como as principais espécies pertencentes a culturas *starter* ou envolvidas em fermentações espontâneas. Hugas (1998) descreveu que estirpes de *L. sakei* e *L. plantarum* pertencem à microbiota natural de carnes e de produtos à base de carne, sendo que então a sua participação nas propriedades organolépticas de produtos a base de carne sejam, além de inevitáveis, imprescindível para o desenvolvimento do produto.

Drosinos e colaboradores (2005) identificaram em enchidos fermentados de origem grega que 88,6 % dos isolados eram *Lactobacillus*, sendo o microrganismo com a maior presença nos isolados. Destes *Lactobacillus* 37,2 % pertenciam a espécie *L. plantarum* e apenas 3,5 % da espécie *L. sakei* (Drosinos *et al.*, 2005). As pesquisas de Urbaniak & Pezacki (1975), citado por Jay (2000), revelaram que *Lactobacillus plantarum* foi, dentre todos, o microrganismo fermentador mais isolado em produtos fermentados em que culturas *starters* não tenham sido utilizadas (Jay, 2000). Sawitzki e colaboradores (2009) relataram que de 10 estirpes isoladas de enchidos fermentados naturalmente, 5 representavam a espécie *L. plantarum* (Sawitzki *et al.*, 2009).

Ammo & Mayo (2006) descrevem *L. sakei* como a espécie mais competitiva entre outros *Lactobacillus*, pois apresentam uma fase lag mais curta e uma taxa alta de crescimento com uma alta densidade celular (Ammo & Mayo, 2006). Leroy & Vuyst (2003) estabeleceram um modelo para o decréscimo do pH, referente a utilização de estirpes de *L. sakei*, onde apontam que 12 g/L de ácido láctico são necessários para atingir um pH final no produto de 4.0 (Leroy & Vuyst, 2003). O estudo de Chaillou e colaboradores (2013) analisou a eficiência de culturas contendo diferentes estirpes de *L. sakei* em produtos cárneos e constatou uma maior eficiência na inibição de microrganismos patogénicos e de microbiota deteriorativa quando duas ou mais estirpes do mesmo microrganismo eram utilizadas (Chaillou *et al.*, 2013).

Além de acontecimentos simples para a selectividade do meio, como a competição por nutrientes, por oxigénio, pelo sítio de fixação e da produção de ácido láctico, as BAL ainda possuem outros mecanismos para aumentar a selectividade do meio com a produção de inúmeras outras substâncias inibitórias como o ácido acético, acetoína, peróxido de hidrogénio, bacteriocinas entre outras substâncias (Hugas, 1998; Keenan & Lindsay, 1967).

4.1.1 Propriedades desejáveis de culturas *starters*

Uma das principais funções na utilização de culturas *starters* é garantir a segurança do alimento, sendo que além de proteger o alimento a cultura não deve ter potencial patogénico ou tóxico. As qualidades/propriedades desejáveis para a escolha de uma cultura *starter*, como tem sido descritas por vários autores (Holzapfel *et al.*, 1995; Lücke, 2000; Ammo & Mayo, 2007). Salientam-se algumas das propriedades mais relevantes:

1. Não apresentem risco para a saúde; Não produzam toxinas, aminas biogénicas ou outros metabolitos prejudiciais à saúde; não possuam carácter patogénico.
2. Que adicionem benefícios ao produto: apresentem boa adaptação ao produto/substrato; homogeneidade da actividade protectora durante o tempo necessário ou durante o período de vida útil do produto; que permitam prever a actividade metabólica da cultura sob parâmetros estabelecidos referentes ao produto (ex.: produção de ácido láctico, mas sem a produção de gás); que aumentem a vida de prateleira do produto, inibindo mudanças causadas por microrganismos deteriorativos e outras reacções; que melhorem a segurança do produto pela inactivação/eliminação de agentes patogénicos ou outros indesejáveis ao processo; que apresentem actividade enzimática desejável (ex.: para carnes, catalase, enzimas redutoras de nitrato).
3. Que melhorem a diversidade de produtos, a partir da matéria prima permitam obter um produto com as características desejáveis, isto é que não apresentem ou desenvolvam efeitos negativos na qualidade sensorial dos produtos (ex.: produção de ácidos indesejáveis, gases e outros).
4. Que promovam benefícios para a saúde por efeitos positivos na microbiota intestinal
5. Que funcionem como indicador em casos de condições adversas.

A Tabela 4.4 – Algumas das principais propriedades desejáveis e indesejáveis de culturas *starters*. resume algumas das principais propriedades desejáveis e indesejáveis de culturas *starters*.

Tabela 4.4 – Algumas das principais propriedades desejáveis e indesejáveis de culturas *starters*. Fonte: Adaptado de Ammo & Mayo, 2007; Leroy *et al.*, 2006.

Desejável	Indesejável
Propriedades tecnológicas: <ul style="list-style-type: none"> • Produção de ácido láctico • Crescimento em diferentes temperaturas, concentrações de soluto e pH • Actividade catalítica e hidrolítica de peróxido de hidrogénio • Redução de nitrato e nitrito • Actividades enzimáticas proteolíticas e lipolíticas • Tolerância e sinergia com outros microrganismos presentes na cultura starter Segurança alimentar & Biopreservação: <ul style="list-style-type: none"> • Acidificação do meio • Produção de bacteriocinas Ação probiótica: <ul style="list-style-type: none"> • Tolerância ao pH e sais biliares do tracto gastro intestinal • Aderência a mucosa intestinal • Antagonismo a microrganismos patogénicos • Propriedades nutracêuticas 	<ul style="list-style-type: none"> • Produção de gases a partir de glúcidos • Produção de aminas biogénicas • Resistência a antibióticos

4.1.1.1 Potencial bacteriocinogénico: produção de bacteriocinas

Segundo Joerger & Klaenhammer (1990) bacteriocinas podem ser definidas como agentes antimicrobianos de origem proteica que apresentam ação bactericida. Bacteriocinas são em geral pequenos peptídeos ou proteínas, que são sintetizadas e produzidas apenas na fases exponencial do crescimento bacteriano (Joerger & Klaenhammer, 1990). Riley & Wertz (2002) relataram que as bacteriocinas apresentam toxicidade apenas para microrganismos taxonomicamente próximos ao produtor, isto é, semelhante às bactérias produtoras, possuindo uma estreita faixa de actuação (Riley & Wertz, 2002). Já Cotter e colaboradores (2005) relatam que certas bacteriocinas podem possuir um amplo espectro de actuação (Cotter *et al.*, 2005). Diferentemente, os antibióticos são definidos como metabólitos secundários, apesar de possuírem um espectro maior de actuação não possuem uma atividade maior de actuação em microrganismos semelhantes aos microrganismos produtores (Zacharof & Lovitt, 2012).

Uma das possíveis funções das bacteriocinas é a de participarem num complexo sistema de comunicação entre células responsável pelo *quorum sensing*. Este mecanismo de troca de sinais pelo ambiente é responsável pela coordenação de uma função entre as células que passam a actuar de maneira igual visando um objetivo comum como a sobrevivência, a adaptação à disponibilidade de nutrientes, protecção contra componentes tóxicos, defesa contra outros microrganismos. Os microrganismos patogénicos utilizam este sistema para a escolha do momento apropriado para a expressão de factores de virulência. Esta troca de informações pela secreção de compostos químicos pode-se realizar entre microrganismos de uma mesma espécie ou entre espécies diferentes (Kievit & Iglewski, 2000; Miller & Bassler, 2001; Riley & Wertz, 2002).

As bacteriocinas são seguras para a alimentação humana, pois para além de possuírem um peso molecular pequeno, sendo menores que 10 kDa, são facilmente degradadas por enzimas proteolíticas, em especial por proteases presentes no tracto gastrointestinal de mamíferos (Zacharof & Lovitt, 2012). Possuem diversas variações de tamanho, peso, alvos de actuação, modelos de ação e mecanismos de imunidade (Riley & Wertz, 2002).

Apesar de todo o potencial tecnológico as bacteriocinas produzidas por BAL possuem algumas desvantagens, como inibir microrganismos de culturas *starters* que seriam desejáveis a certos produtos (Holzapfel *et al.*, 1995).

4.1.2 Propriedades indesejáveis de culturas *starters*

Algumas características de bactérias que compoñham uma cultura *starter* podem não ser desejáveis para a preparação de enchidos cárneos fermentados, como a produção de gás, síntese de aminas biogénicas, produção de peróxido de hidrogénio, entre outros. *Lactobacillus* também podem apresentar um caráter deteriorativo, pela modificação das propriedades sensoriais dos produtos, como sabor, textura, cor, muco e a formação de aminas biogénicas (Papamanoli *et al.*, 2002).

Apesar de BAL serem consideradas seguras para a alimentação podem apresentar certo risco, como a transferência de genes de resistência a antibióticos para outros microrganismos e algumas estirpes podem produzir enterotoxinas (Ammo & Mayo, 2007; Holzapfel *et al.*, 1995; Vidal-Carou *et al.*, 2007).

4.1.2.1 Produção de peróxido de hidrogénio

A produção de peróxido de hidrogénio pode ser uma característica de algumas BAL, a presença do peróxido de hidrogénio pode acarretar em um gosto levemente ácido e em produtos cárneos favorece a rancificação, pode ainda levar à uma descoloração ou coloração esverdeada do produto (Kröckel, 2013).

O peróxido de hidrogénio também atua como bacteriostático contra microrganismos Gram positivos, mas possui um efeito bacteriocida contra microrganismos Gram negativos (Papamanoli *et al.*, 2002).

4.1.2.2 Produção de gás

BAL heterofermentativas possuem a capacidade de produzir CO₂, característica a qual indesejada na produção de enchidos fermentados, uma vez que a presença de gás pode interferir nas qualidades organolépticas do produto. BAL heterofermentativas, podem ainda produzir concentrações inadequadas de ácido acético formando um sabor desagradável no produto (Ammor & Mayo, 2007; Kröckel, 2013).

4.1.2.3 Aminas biogénicas

BAL podem também estarem relacionadas com a produção de aminas biogénicas como a histamina, em produtos fermentados, compostos estes gerados pela descarboxilação de aminoácidos, reação proveniente da atividade metabólica destes organismos. Straub e colaboradores (1995) relata que, em seus estudos, o potencial de risco para a produção de aminas biogénicas não foi relatado em estirpes de BAL utilizadas em culturas *starters*, incluindo *Pediococcus*, mas em apenas algumas estirpes de *L. plantarum* (Straub *et al.*, 1995).

No estudo realizado por Bover-Cid e colaboradores (2001) onde 66 estirpes de *Lactobacillus*, provenientes de enchidos fermentados foram analisadas, aproximadamente 32% destas estirpes produziam aminas biogénicas (Bover-Cid *et al.*, 2001). Sendo que dentre as estirpes de *L. plantarum* e de SCN nenhuma apresentou atividade de descarboxilação, isto é, não produziam enzimas responsáveis pela síntese de aminas (Silva *et al.*, 2013), sendo assim não houve produção de aminas biogénicas por estas estirpes, entretanto algumas das estirpes de *L. sakei* apresentaram a formação de aminas biogénicas. Bover-Cid e colaboradores (2001) também citam que a formação de aminas biogénicas esta relacionada mais intimamente a estirpes específicas e não a espécie de microrganismos, entretanto também concluíram que dentre os *Lactobacillus* as espécies *plantarum* e *sakei* seriam mais adequadas para a constituição de culturas *starters*, devido as suas propriedades tecnológicas e sua característica de serem não produtoras de aminas biogénicas (Bover-Cid *et al.*, 2001).

4.2 Microbiota deteriorativa e patogénica presente em produtos cárneos

A deterioração pode ser definida como um fenómeno que engloba as mudanças do substrato durante o desenvolvimento da microbiota específica do produto (Nychas *et al.*, 2008). Dentre os principais organismos deteriorativo encontrados em produtos cárneos fermentados podem-se citar *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium spp.*, *Leuconostoc spp.* e *Pseudomonas*; e *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus* apontados como os principais agentes patogénicos.

Na Tabela 4.5 apresenta alguns dos microrganismos patogénicos encontrados em enchidos cárneos fermentados e suas respectivas patologias.

Tabela 4.5 – Microrganismos patogénicos encontrados em enchidos cárneos fermentados. Fonte: Ray, 2000.

	Microrganismo	Grupo microbiológico	Sintoma
Intoxicação			
<i>Sthapylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	Gram +	Gastrointestinal
Infecção			
Salmonelose	<i>Salmonella</i>	Gram-	Gastrointestinal
Gastroenterite Hemorrágica	<i>E. coli</i> O157:H7	Gram-	Gastrointestinal
Gastroenterite (não hemorrágica)	<i>E. coli</i> (toxina Shiga)	Gram-	Gastrointestinal
Toxinfecção			
Gastroenterites	<i>E. coli</i> (enteropatogénica)	Gram-	Gastrointestinal

Algumas bactérias lácticas que tenham caráter heterofermentativo, como *Carnobacterium*, *Leuconostoc* e *Weissella* estão comumente associadas à deterioração de carne e produtos cárneos (Ammor & Mayo, 2007; Kröckel, 2013). *B. thermosphacta* é um dos principais agentes deteriorativos em carnes e em produtos cárneos fermentados, é responsável pela descoloração e pela produção de *off-flavours*, produzidos pela quebra de proteínas e lipídios, dando viscosidade ao produto (Feiner, 2006; Stiles, 1996). *Penicillium* também pode ser listado como um microrganismo deteriorativo em produtos cárneos (Ray, 2005). *Leuconostoc* pode ter caráter deteriorativo em carnes processadas, mas também participar na produção de queijos, de vegetais fermentados como o chucrute, e vinhos (Raposo *et al.*, 2007; Stiles, 1995).

Microrganismos patogênicos como *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* são frequentemente referidos como presentes em enchidos cárneos fermentados (Paramithiotis *et al.*, 2010). Contudo, vários autores relatam que *L. monocytogenes* está comumente presente na matéria prima (carne) mas não está normalmente presente no produto final (enchido cárneo fermentado) (Lebert *et al.*, 2007b). Outros agentes patogênicos como a *Salmonella* não são normalmente encontrados em produtos cárneos fermentados (Drosinos *et al.*, 2005; Lebert *et al.*, 2007b).

Dentre os perigos microbiológicos encontrados em produtos cárneos fermentados, suas principais condições de crescimento e possíveis métodos de controle estão destacados na Tabela 4.6.

Mesmo com a redução do pH e A_w e com o crescimento de BAL favorecido, alguns microrganismos patogênicos ainda possuem tolerância a pH mais ácidos, como é o caso de *E. coli* que suporta um pH com valores entre 4,0 a 9,0, sendo que a infecção humana por este agente pode ocorrer com pequenas doses (Esteves, 2005; Paramithiotis *et al.*, 2010; Kröckel, 2013). Por isto a obtenção de uma matéria prima de qualidade, com contaminação bacteriana mínima, é essencial para o controle do produto, uma vez que medidas preventivas de controle de perigos, boas práticas de fabricação, implementação do sistema HACCP podem assegurar a qualidade e segurança da transformação da matéria prima até ao produto final.

Outros agentes descritos como um perigo biológico pela *United States Department of Agriculture* (USDA, 1999) são os parasitas. *Trichinella spiralis* é um nemátode que habita o intestino de animais como cães, gatos, suínos e humanos e é responsável pela Triquinelose. A sua prevenção consiste em procedimentos que envolvem a formulação e processos de cura, o corte da carne, a utilização de congelação da matéria prima, tempo e temperaturas adequadas durante a secagem do produto (USDA, 1999). Outros agentes como *Taenia solium* e *Cysticercus* podem estar presentes na matéria prima, mas são inativados ou descartados durante os primeiros dias de processamento (Gamble, 1997; Gonzalez *et al.*, 2003).

Tabela 4.6 – Requisitos para o crescimento dos principais perigos biológicos de enchidos fermentados e medidas de controlo. Fonte: Adaptado de: Feiner, 2006; De Vos *et al.*, 2009; Ray, 2000; Silva, 2003; USDA, 1999.

Agente	Controlo	Temperatura	pH	A _w
<i>E. coli</i>	Processamento térmico adequado. Acidez do meio. Procedimentos de higiene do ambiente. Condições adequadas de armazenamento.	7 – 45 °C	4.0 – 9.0	0.95
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tratamento apropriado com calor, programa de higiene e desinfecção, separação de matérias primas dos produtos prontos para consumo.	2.5 – 44 °C	5.2 – 9.6	0.92
<i>Salmonella</i>	Combinações de processos como fermentação láctica e cura. Controlo de condições higiénicas de fabrico. Controlo de contaminação cruzada.	5 – 46 °C	4.0 – 9.0	0.95
<i>S. aureus</i>	Boas práticas de higiene pessoal. Controlo de tempo e temperatura de alimentos.	6.5 – 46 °C	5.2 – 9.0	Aerobiose 0.86 Anaerobiose 0.91
<i>Yersinia enterocolítica</i>	Utilização de ar refrigerado no armazenamento de carcaças. Implementação de medidas de higiene no processo de fabrico. Refrigeração apropriada, tratamento térmico, controlo do sal e acidez. Prevenção de contaminação cruzada.	2 – 45 °C	4.6 – 9.6	0.95
<i>C. botulinum</i>	Controlo do pH. Adição de nitritos e sal, refrigeração, acidificação do pH < 4.6 e redução do A _w < 0.93.	Grupo I (toxina tipo A, B e F) 10 – 48 °C	4.6	0.95
		Grupo II (toxina B, E e F) 3.3 – 45 °C		0.98
<i>Campylobacter jejuni</i>	Utilização de ar refrigerado no armazenamento de carcaças. Implementação de medidas de higiene no processo de fabrico. Evitar contaminação cruzada. Condições apropriadas de aquecimento, arrefecimento e congelação.	30 – 47 °C	4.7 – 7.5	>0.97
<i>Bacillus cereus</i>	Condições apropriadas de aquecimento e arrefecimento.	10 – 48 °C	4.9 – 9.3	0.91
<i>Clostridium perfringes</i>	Condições apropriadas de aquecimento, arrefecimento e cozedura (tempo: temperatura).	15 – 50 °C	5.5 – 8.0	0.95

4.2.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é um bacilo Gram positivo, anaeróbio facultativo, flagelado e intracelular facultativo, isto é, invade e reproduz-se dentro de células do corpo humano sendo que a doença em humanos é de origem alimentar (Lorber, 2007; Pizarro-Cerdá & Cossart, 2007). O mecanismo de invasividade deste agente ocorre por fagocitose da *L. monocytogenes* por parte da célula hospedeira e uma vez dentro do vacúolo produz listeriolisinas e fosfolipases que destroem a membrana do vacúolo, libertando a *L. monocytogenes* no meio intracelular e

permitindo assim que ocorra infecção de célula-a-célula no hospedeiro (Hernandez-Milian & Payeras-Cifre, 2013).

Para além da *L. monocytogenes*, outras onze espécies estão presentes no género *Listeria*, são elas *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. murrayi*, *L. denitrificans*, *L. fleischmannii* e *L. weihenstephanensis*. Destas, além da *L. monocytogenes*, apenas *L. ivanovii* é considerada patogénica e afeta basicamente ruminantes, para humanos apenas a *L. monocytogenes* é considerada patogénica (Chen, 2012; Lorber, 2007; Jamali & Thong, 2014).

Sendo a principal espécie patogénica, *L. monocytogenes* apresenta 13 sorovares diferentes os quais estão muito relacionados com a *L. innocua* e *L. seeligeri*. Esta aproximação destas espécies faz com que a *L. innocua* seja muitas vezes relacionada como a variante não patogénica da *L. monocytogenes* (Jay, 2005). Apesar de possuir treze diferentes sorotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7) os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b são os mais associados a doenças de origem alimentar (Chen, 2012; Lorber, 2007, Jian *et al.*, 2008). O género *Listeria* é tolerante ao sal e também a meios ácidos, podendo desenvolver-se também em temperaturas de refrigeração (2 – 4 °C) e também abaixo de 1 °C (Chen, 2012; Gandhi & Chikindas, 2007), sendo um microrganismo persistente em alimentos refrigerados. É referida a sua presença, também em enchidos cárneos fermentados principalmente os que sofrem fadiga (Diez & Patarata, 2013), persistindo em ambientes de fabrico e em ambientes domésticos (Codex Alimentarius, 2007).

L. monocytogenes não é um dos principais agentes causadores de doenças alimentares, mas em comparação com agentes como a *Salmonella* é um dos que possuem elevadas taxas de mortalidade, entre 15 – 30 %, para casos de meningite causadas por *L. monocytogenes* as taxas de mortalidade aumentam até 70 %, para casos de septicemia até 50 % e os casos de infeções neonatais possuem as maiores taxas, 80 % (Chen, 2012).

A transmissão da doença pode ser feita verticalmente, entre mãe e filho, zoonótica, entre homens e animais, e até mesmo hospitalar. A infecção por via oral é a mais comum, ocorrendo quando alimentos que contenham *L. monocytogenes* são ingeridos sem tratamento prévio, como por exemplo, pelo calor (Chen, 2012, FAO, 2004). A dose infectante não é propriamente estabelecida, a dose-resposta pode variar de acordo com a susceptibilidade do hospedeiro, com a patogenicidade e virulência da estirpe, assim como com a complexidade da matriz envolvida (Chen, 2012). *L. monocytogenes* consegue atravessar barreiras naturais do organismo humano, como a barreira hematoencefálica, transplacentária e intestinal (Hernandez-Milian & Payeras-Cifre, 2013; Lorber, 2007).

As fontes alimentares mais associadas a *L. monocytogenes* incluem o leite cru ou inadequadamente pasteurizado, leite achocolatado, queijos, queijos fabricados com leite não pasteurizados, em particular queijos moles, gelados, vegetais crus, carne cruas, enchidos cárneos fermentados, peixes crus e fumados entre outros produtos. Também pode ser encontrada em hortícolas frescos como rabanetes e repolhos (Codex Alimentarius, 2007; Gandhi & Chikindas, 2007; González *et al.*, 2013; Schlech, 2000). Para além destes alimentos,

pode ser encontrada nos mais diversos ambientes como no solo, em vegetação em decomposição, fezes de animais (Chen, 2012; Codex Alimentarius, 2007; Lorber, 2007).

A contaminação do produto não precisa de ser necessariamente proveniente da matéria prima, pois durante a preparação do produto podem ocorrer contaminações cruzadas, provenientes de utensílios, manipuladores e outros (Goh *et al.*, 2014). O estudo de Lebert e colaboradores (2007b) analisou o ambiente de uma indústria de enchidos cárneos francesa, onde relatou que *L. monocytogenes* foi encontrada em facas e mesas de corte (Lebert *et al.*, 2007b). A produção de biofilme pela *L. monocytogenes* pode promover a contaminação do ambiente fabril, esses agregados celulares interferem na eficiência de procedimentos de limpeza, podendo persistir e contaminar novos locais (Bonsaglia, 2014; Norwood & Gilmour, 2000).

As infecções causadas por *L. monocytogenes* possuem um período de incubação curto de algumas horas até 2 a 3 dias. Os casos mais severos normalmente possuem períodos de incubação mais longos, de 3 dias até 3 meses (Chen, 2012; Lorber, 2007). Casos leves de listeriose podem ocasionar sintomas como febre, dores musculares, náuseas, vômitos e diarreias. Infecções mais severas podem afetar o sistema nervoso levando a dores de cabeça, endurecimento dos músculos do pescoço, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões. A duração destes sintomas podem variar de acordo com o estado imunitário do indivíduo, podendo durar de dias a semanas (Chen, 2012).

Infecções em humanos podem ter duas vertentes, uma doença gastrointestinal não invasiva ou invasiva podendo levar a meningite e septicemia. Na maioria da população saudável os sintomas podem ser febres agudas e distúrbios gastrointestinais, em indivíduos imunocomprometidos podem ocorrer septicemias e meningites. A listeriose pode causar sintomas leves em gestantes, como dores no corpo, mal estar e dores de cabeça, entretanto é de grande risco para o feto em desenvolvimento, casos de listeriose em grávidas podem levar a abortos, parto mortos e os bebês que nasçam vivos podem sofrer de septicemia bacteriana e meningite (Chen, 2012; Schlech, 2000).

O diagnóstico pode ser realizado por análise de tecidos, sangue, líquido cefalorraquidiano ou outros fluídos corporais estéreis (como da placenta ou do feto). Culturas realizadas a partir de fezes humanas não podem ser utilizadas para o diagnóstico, uma vez que a microbiota intestinal possa normalmente conter *L. monocytogenes* (Chen, 2012).

Os principais grupos populacionais afetados são comumente: grávidas e neonatos (infecções pré-natais e infecções em neonatos), indivíduos imunocomprometidos (em tratamento com corticosteroides, quimioterapia e outros tratamentos relacionados ao cancro, SIDA, leucemia, diabéticos, pacientes com cirrose, idoso, etc.), indivíduos saudáveis também fazem parte do grupo de risco, com a possibilidade de ingerir alimentos que contenham grandes quantidade de *L. monocytogenes*. Indivíduos que estejam sob tratamentos com a utilização de cimetridina ou antiácidos podem possuir uma predisposição (Chen, 2012).

L. innocua não possui a patogenicidade da *L. monocytogenes* e pode ser encontrada nos mesmo ambientes. Entretanto diferentes estudos indicam que o crescimento de *L. innocua*

pode afetar o crescimento de *L. monocytogenes* (Koo *et al.*, 2014; Yokoyama, 1998; Yokoyama, 2005).

Jian e colaboradores, (2008) constataram que de 20 estirpes de *L. monocytogenes*, isoladas de produtos alimentares prontos para consumo, um total de 19 estirpes apresentavam factores de virulência (Jian *et al.*, 2008). Um estudo de Mena *et al.* e colaboradores (2004), demonstra a grande presença de *Listeria* spp. em cozinhas portuguesas, onde em carnes cruas os valores chegaram até 60% (frango) e de até 25% (fiambre) para produtos cárneos, demonstrando a persistência do microrganismo mesmo depois do processamento (Mena *et al.*, 2004).

Na maioria dos casos *L. monocytogenes* pode ser destruída durante a fase de fumagem e secagem do produto. Em enchidos secos, este patogénico é eliminado durante as fases finais do produto (Petäjä-Kanninen & Puolanne, 2007).

Presentemente, a identificação bacteriana a nível de espécie para *L. monocytogenes* pode ser realizada de diferentes maneiras, o diagnostico convencional é realizado através de caldos seletivos de enriquecimento e agares de recuperação e multiplicação, também podem ser utilizados testes bioquímicos, outras técnicas a nível molecular tem como exemplo o PCR (reação em cadeia de polimerase), análise por enzimas de restrição, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), entre outras (Andrade, *et al.*, 2010).

No estudo de Simon e colaboradores (1996), o mesmo método citado no último parágrafo foi realizado utilizando *L. seeligeri*, *L. innocua* e *L. ivanovii*, e duas estirpes de *L. monocytogenes*, apenas estas últimas apresentaram bandas no gel de agarose (Simon *et al.*, 1996). Este método de PCR baseia-se na presença do gene *prfA*, o qual é responsável pela síntese da proteína PFRA, esta proteína está relacionada a um controlo positivo da patogenicidade em *L. monocytogenes* (Heras *et al.*, 2011).

A presença do produto de amplificação visível no gel de agarose indica a presença do gene específico *prfA*. Este gene está ligado à invasão e movimentação intracelular da *L. monocytogenes*, ou seja, à sua patogenicidade. É ele o responsável pelo fator regulatório de pleiotropia (*pleiotropic regulatory factor*), isto é, quando um gene controla diversas características relacionadas ao fenótipo do microrganismo, incluindo seu comportamento. A virulência em *L. monocytogenes* é multifatorial, mas este gene é responsável pela regulação central do fator de virulência deste microrganismo, é um fator importante no desencadeamento da virulência em *L. monocytogenes* (Heras *et al.*, 2011; Ludwig, 2009b). A sua ativação é que torna a *L. monocytogenes* em um microrganismo patogénico (Moreno, 2013). Este gene é responsável pela ativação de outros genes ligados a agressividade da *L. monocytogenes*, como *inlA* e *inlB* que são genes responsáveis pela sintetização de internalinas, proteínas de superfície com atividade invasiva (Ludwig, 2009b; Moreno, 2013).

5. UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO COMO CULTURAS PROTECTORAS EM ENCHIDOS FERMENTADOS PORTUGUESES

5.1 Objectivos e justificação

O objetivo desta dissertação é avaliar a capacidade de bioconservação de três estirpes de *Lactobacillus*, previamente isoladas de produtos cárneos fermentados, usados isoladamente contra diversos microrganismos patogénicos e deteriorativos que podem ser encontrados em produtos cárneos. Foi-se avaliado também a produção de L(+) e D(-) ácido láctico das estirpes de *Lactobacillus* utilizadas, caracterizando a produção de ácido láctico de modo a uma selecção mais criteriosa. Na última parte deste trabalho, duas estirpes serão seleccionadas para serem avaliadas em ensaios de antagonismo contra *L. innocua*, tenha sido inoculadas em massa tradicional de chouriço e em carne sem condimentação, para melhor avaliar a sua capacidade de inibição e possível futura participação em culturas *starters* ou iniciadoras protectoras.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Origem dos isolados de *Lactobacillus* em estudo

O estudo realizado neste trabalho experimental utilizou vários isolados de *Lactobacillus* selvagens (n=3) e de colecção de referência (n=2), *Listeria monocytogenes* selvagens (n=5) e diversos isolados de espécies associadas à deterioração de produtos cárneos, tecnológicas ou patogénicas de referência (n=10) pertencentes à colecção de isolados da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar, Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal.

6.1.1 Origem das estirpes de *Lactobacillus* em estudo

As estirpes de *Lactobacillus* utilizadas (Tabela 6.1) foram isoladas de produtos cárneos fermentados, em diferentes fases de fabrico, e do ambiente de produção de diferentes indústrias situadas na região do Alentejo, Portugal. A sua identificação foi previamente efectuada por técnicas de biologia molecular (Berthier & Ehrlich, 1998).

Tabela 6.1 – Origem e identificação das estirpes de *Lactobacillus* utilizadas.

Código	Género	Espécie	Origem
P05-15	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i>	Enchedora
P3B7	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i>	Meio de cura
CV3C2	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. sakei</i>	Produto acabado

6.1.2 Origem de isolados selvagens de *Listeria monocytogenes*

Várias *L. monocytogenes* selvagens (n=5) (Tabela 6.2), foram isoladas de produtos cárneos prontos para consumo e de superfícies de contacto com o alimento em indústrias da região central de Portugal, na região metropolitana de Lisboa (Henriques *et al.*, 2014).

Tabela 6.2 – Origem e identificação dos isolados de *Listeria monocytogenes* selvagens utilizados.

Código	Género	Espécie	Origem	Sorotipo
A41	<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Superfície de contacto	1/2c
A51	<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Superfície de contacto	4b
131	<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Superfície de contacto	1/2b
18S4	<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Produto acabado	4a
11S1	<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Produto acabado	1/2a

6.1.3 Estirpes de referência utilizadas nos ensaios de avaliação do potencial bacteriocinogénico, caracterização da produção de ácido láctico e no ensaio de antagonismo/competição.

A avaliação do potencial bacteriocinogénico e posteriormente de antagonismo/competição dos isolados em estudo foi acompanhada pela utilização de estirpes, adquiridas em várias colecções de referência, representantes de microrganismos deteriorativos,

com características tecnológicas e patogénicas, que podem estar habitualmente presentes na microbiota de produtos cárneos fermentados, tais como *Brochothrix thermosphacta* (ATCC 11509), *E. coli* (CCUG 42744), *S. equorum* (DSMZ 20029), *S. xylosum* (ATCC 8166), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Listeria innocua* (CECT 910T), *L. monocytogenes* (CECT934), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Salmonella enteritidis* (CECT 4300). A estirpe *Enterococcus avium* (EA5) sensível a bacteriocinas foi gentilmente cedida pela Dr^a. Andreia Laukova do Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Laboratory of Animal Microbiology, Slovakia.

Para a caracterização da produção de L(+) e D(-) ácido láctico utilizaram-se dois controlos positivos (*L. plantarum* CECT 220 e *L. sakei* ATCC 15323) e um controlo negativo (*S. xylosum* ATCC 8166).

6.1.4 Condições de conservação, preparação e cultura dos isolados em estudo

Todos os isolados utilizados nos diferentes ensaios preconizados neste estudo estavam armazenados a -80 °C, em criotubos de conservação contendo *Brain Heart Infusion* (BHI, Scharlau, Espanha) suplementado com 15 % de Glicerol (Merck, Alemanha). Antes da utilização, as culturas conservadas foram descongeladas à temperatura ambiente e semeadas.

Para cada estirpe de *Lactobacillus* foram semeados cerca de 10 µL de inóculo em placas com meio Man Rogosa & Sharp agar (MRS, Scharlau, Espanha) durante 3 dias, a 30 °C com gerador de gás para cultura em jarra de bactérias microaerófilas (GENbox Microaer, bioMérieux, França).

Os isolados de *Listeria monocytogenes* e *L. innocua* (n=7) foram cultivadas em meio Triptona Soja Agar (TSA, Scharlau, Espanha) ou Columbia agar suplementado com 5 % de sangue (COS, bioMérieux, França) e incubadas durante 1 a 2 dias, a 37 °C.

As estirpes de *Brochothrix thermosphacta* (ATCC 11509) *Enterococcus avium* (EA5), *E. coli* (CCUG 42744), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Salmonella enteritidis* (CECT 4300) foram cultivadas em meio MRS agar (Scharlau, Espanha) ou TSA agar (Scharlau, Espanha) e incubadas a 30 °C ou 37 °C, em função das condições óptimas de crescimento dos respectivos microrganismos.

6.2 Caracterização da capacidade inibitória das estirpes *Lactobacillus* em estudo

6.2.1 Avaliação do potencial bacteriocinogénico

Para a avaliação do potencial bacteriocinogénico das estirpes de *Lactobacillus* foi realizado o método qualitativo adaptado de Skalka e colaboradores (1983) e Skalka (1986)

Placas de meio MRS agar a 1,5 % agar foram previamente preparadas e identificadas com nome do microrganismo a ser testado, nome do microrganismo competidor e data. Foi traçada uma linha na parte exterior, ao centro de cada placa, com caneta de acetato, para servir de guia durante a realização das riscas de cultivo dos microrganismos a serem testados.

Uma cultura bacteriana para cada uma das estirpes de *Lactobacillus* em teste (n=3) foi realizada a partir de criotubos de conservação com o auxílio de uma ansa (10 µL) em placa de meio MRS agar (Scharlau, Espanha) e incubadas durante 24 horas a 30 °C em ambiente de microaerofilia, com a utilização de um gerador de gás para cultura em jarra de bactérias microaerófilas (GENbox Microaer, bioMérieux, França).

A partir das culturas bacterianas realizou-se com o auxílio de ansa (10 µL) uma risca por placa de MRS agar (Scharlau, Espanha) para cada *Lactobacillus* correspondente, efectuando-se outra réplica em paralelo. A incubação da cultura foi efetuada durante 24 horas a 30 °C em ambiente de microaerofilia.

Posteriormente foi adicionada e distribuída homogeneamente sobre as linhas a mistura de 200 µL da estirpe *Enterococcus avium* EA5 (LAM - IAP SAS, Kosice, Eslováquia) usada como sensível (previamente cultivada a 30 °C durante 18 horas, de densidade óptica (DO à uma absorbância de 625 nm), com valores entre 0,8 e 1,0 em espectrofotômetro (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech, Suécia), com 4 mL de meio BHI 0,7 % agar (BHI 0,7 % agar, Scharlau, Espanha), liquefeito a cerca de 40 °C. As placas foram novamente incubadas a 30 °C durante 24 horas. Os resultados exprimem as dimensões em centímetros das zonas de inibição formadas pelas estirpes de *Lactobacillus* contra a estirpe sensível EA5 (LAM- IAP SAS, Kosice, Eslováquia). O mesmo procedimento (Figura 6.1) foi utilizado para todos os outros microrganismos deteriorativos, tecnológicos e patogénicos. Estes ensaios foram repetidos duas vezes.

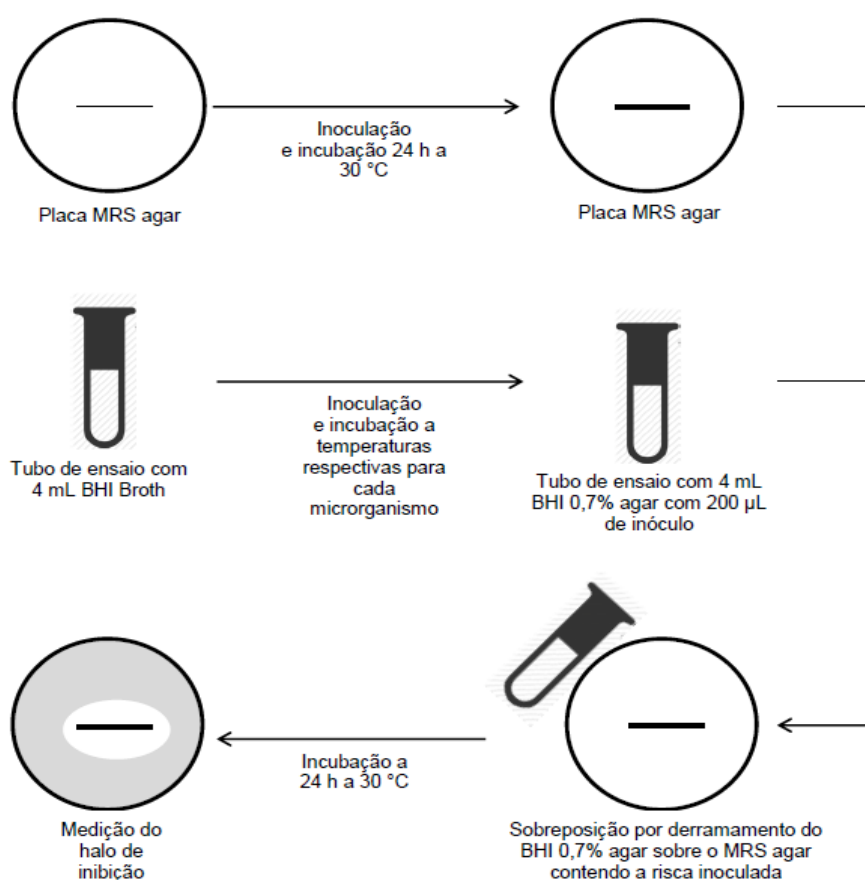


Figura 6.1 – Diagrama do procedimento para a avaliação bacterocinogénica dos isolados.

6.2.2 Determinação da produção de L(+) e D(-) ácido láctico

Os microrganismos em teste a partir de cultura em placa de MRS agar (Scharlau, Espanha) foram inoculados com o auxílio de uma ansa (10 µL) em tubos de ensaio contendo 4 mL de caldo MRS (Scharlau, Espanha), sendo incubados durante 24 horas a 30 °C. Esta cultura foi centrifugada durante 5 minutos em centrífuga Eppendorf 5415R (Eppendorf, Alemanha) a 13.000 rpm. O sobrenadante foi adicionado na quantidade de 10 µL num tubo *eppendorf* contendo 500 µL de água destilada e agitado em vortex.

A avaliação da produção de L(+) e D(-) ácido láctico foi realizada em duplicado e de acordo com metodologia estabelecida pelo Kit D-/L-Latic acid, UV method Nzytech® (Nzytech, Portugal).

Foram utilizados na realização do ensaio dois controlos positivos (*L. plantarum* CECT 220 e *L. sakei* ATCC 15323) e um controlo negativo (*S. xylosus* ATCC 8166).

Na Tabela 6.3 descrevem-se os reagentes utilizados e suas respectivas quantidades.

Tabela 6.3 – Reagentes utilizados na determinação da composição em L(+) e D(-) ácido láctico. Adaptado de: Kit D-/L-Latic acid, UV method Nzytech, Portugal

Reagentes	Branco	Amostras
Água (mL)	1,6	1,5
Amostra (µL)	--	100
Solução 1 (µL) (D-Glutamato)	500	500
Solução 2 (µL) (NAD ⁺)	100	100
Suspensão (µL) (D-ALT)	20	20
Suspensão 4L (µL) (L-LDH) ou Suspensão 4D (µL) (D-LDH)	20	20

A produção de ácido láctico pode ser analisada pela presença de NAD⁺ associado à enzima lactato desidrogenase por métodos de colorimetria ou também cromatografia gasosa (Narayanan *et al.*, 2004). Durante a realização do método colorimétrico estabelecido pelo Kit D-/L-Latic acid, UV method Nzytech (Nzytech, Portugal), dois valores de absorvância são obtidos, estes valores são utilizados para determinar a diferença das absorvâncias do branco e das amostras de cada teste realizado. A concentração de D(-) ácido láctico (g/L), ou L(+) ácido láctico (g/L) é baseado na absorvância a 340 nm da quantidade de NADH produzido (6300 L x mol⁻¹ x cm⁻¹), os resultados foram calculados de acordo com as equações descritas abaixo:

$$\Delta \text{Absorvância} = ([\text{abs. 2} - \text{abs. 1}]) - ([\text{abs. branco 2} - \text{abs. branco 1}])$$

$$\text{Concentração de D/L ácido láctico} = 0,3204 * \Delta \text{Abs. D(-) ácido láctico / L(+) ácido láctico}$$

Onde a abs. 1 é a absorvância da mistura sem a adição da suspensão 4L-ácido láctico ou 4D-ácido láctico, e a abs. 2: é a absorvância da mistura após a adição da suspensão 4L-ácido láctico ou 4D-ácido láctico.

6.3 Ensaios de competição / antagonismo *in vitro*

Nestes ensaios duas estirpes foram seleccionadas a partir da avaliação do potencial bacteriocinogénico e suas características de produção de ácido. Estas estirpes foram avaliadas em ensaios de competição/antagonismo contra *L. innocua*, tendo sido para tal realizados dois ensaios distintos com inoculação em (1) massa cárnea sem condimentação e em (2) massa de chouriço. A formulação da massa de chouriço foi efectuada de acordo com o procedimento habitual em salsicharias tradicionais.

Ambos os ensaios foram efectuados em triplicado contemplando a mesma execução.

Os ensaios foram realizados reproduzindo as temperaturas de duas etapas de fabrico dos enchidos: a maturação a 7 °C e a fumagem a 20 °C. Assim, as amostras preparadas foram mantidas durante 2 dias à temperatura de 7 °C, com análises efectuadas às 0, 24 e 48 horas seguindo as amostras para um período de 2 dias submetidas à temperatura de 20° C e analisadas às 72 e 96 horas. Os parâmetros microbiológicos analisados foram os seguintes: contagem de microrganismos AT a 30 °C, contagem de BAL; contagem de *Enterobacteriaceae*; contagem de *Pseudomonas*; contagem de SCN; contagem de *Listeria* spp.. A determinação do pH nas amostras em estudo foi realizada no período de 0, 48 e 96 horas apenas para aquelas em que *L. innocua* não foi inoculada (controlo), como ilustrado na Figura 6.2.

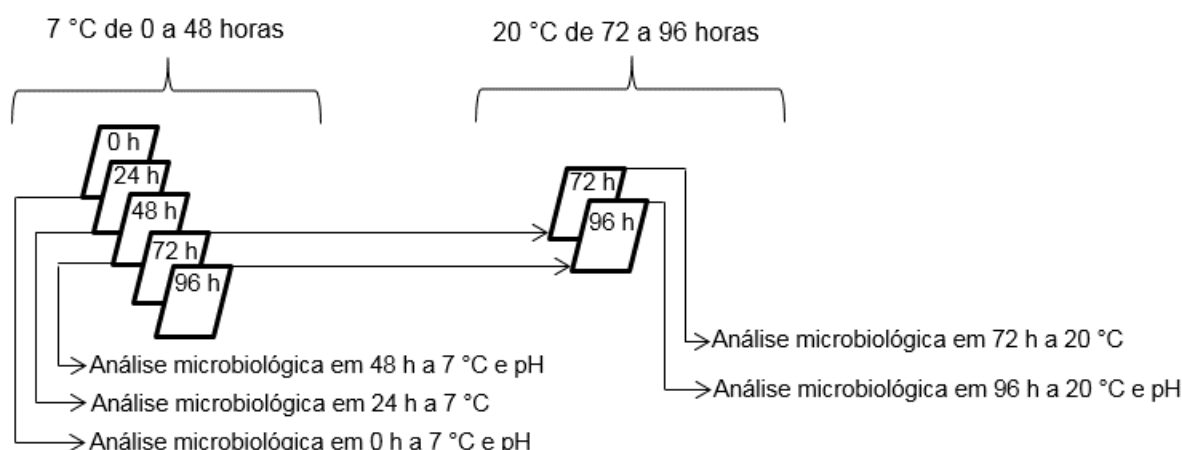


Figura 6.2 – Esquema em imagem para ensaios. O pH foi medido apenas nas amostras em que não foram inoculadas *L. innocua*.

6.3.1 Caracterização da matéria prima utilizada nos ensaios *in vitro*.

A matéria prima era constituída por 70 % de aparas de carne magra e 30% de aparas de gordura, proveniente da desmacha de carcaças de suíno. A carne foi adquirida da empresa Monta D'alva Alimentação SA, Lote VO204, Mod.DSQ 033/02 tendo sido realizada a sua recepção no dia 20 de Janeiro de 2014. Do lote inicial foram retirados aleatoriamente aproximadamente 100 g de aparas para a caracterização microbiológica inicial da matéria prima com pesquisa de *Listeria monocytogenes*, tendo-se efectuado esta avaliação em três amostras diferentes. O lote inicial foi embalado a vácuo em embaladora (Tecnotrip EVT-7, Espanha) e armazenado a temperatura de -20 °C.

Os parâmetros microbiológicos analisados foram os seguintes: contagem de microrganismos AT 30°C, contagem de BAL; contagem de *Enterobacteriaceae*; contagem de *Pseudomonas*; contagem de SCN; contagem de *Listeria* sp. e pesquisa de *L. monocytogenes*. A análise microbiológica da matéria prima foi realizada como descrito em Capítulo 6.3.1.

O posterior descongelamento da matéria prima para preparação das amostras em ensaio foi realizado em câmara frigorífica a temperaturas entre 4 e 5 °C, em períodos de *overnight*.

6.3.2 Preparação e produção da massa de chouriço

A preparação da massa de chouriço foi realizada de acordo com a formulação descrita na Tabela 6.4.

As aparas de carne foram cortadas manualmente respeitando as boas práticas de higiene. Efectuou-se a pesagem criteriosa de todos os ingredientes de acordo com as quantidades expressas na formula.

A mistura de todos os ingredientes foi efectuada com o auxílio de uma misturadora de eixo planetário. Após preparação desta massa, foram pesadas amostras em sacos esterilizados contendo 25 g da massa formulada. O número de sacos necessários para a realização de cada ensaio foi calculado constituindo-se três lotes armazenados a -20 °C. Cada lote correspondeu a uma repetição do ensaio.

Tabela 6.4 – Formulação da massa de chouriço.

Chouriço (2kg)	Quantidade necessária
Carne (70 % magra e 30 % gordura)	1,8 Kg
Vinho Branco	0,1 mL
Água Potável	0,1 mL
Aditivos/Kg	%
Tari Complet P27*	1,2 g
Sal refinado	1,5 g
Massa de pimentão	2,0 g
Massa de alho	0,5 g

Legenda: * BK Giulini GmbH, o suplemento Tari Complet P27 possui em sua composição 40g de dextrose para cada 100g do produto.

6.3.3 Preparação das suspensões de *Lactobacillus* e de *Listeria innocua* para inoculação

Para a realização da inoculação nas amostras para o ensaio *in vitro* foi estabelecida a relação entre a densidade óptica e a concentração celular das suspensões dos isolados de *Lactobacillus* em estudo e de *Listeria innocua*.

A partir de prévia cultura bacteriana procedeu-se à inoculação dos *Lactobacillus* em 4 mL de caldo MRS (Scharlau, Espanha) e de *L. innocua* em 4 mL de caldo BHI (Scharlau, Espanha) incubados a 30 e 37 °C durante 24 horas, respectivamente. Após o período de incubação, a absorvância foi medida em espectrofotómetro (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech, Suécia) a uma absorvância de 625 nm) e se necessário ajustada para valores de DO de 0,5

(representando uma concentração celular de $7 \log^{10}$ UFC/mL) utilizando caldo MRS (Scharlau, Espanha) ou caldo BHI (Scharlau, Espanha) para *Lactobacillus* e *L. innocua* respectivamente.

Após concentração das células por centrifugação (Eppendorf 5415R, Eppendorf, Alemanha) durante 10 minutos a 5 °C numa rotação de 1600 rpm realizou-se lavagem com soluto Triptona-Sal (1 g de Peptona de Caseína (Triptona, Scharlau, Espanha) e 8,5 g de Cloreto de sódio (Scharlau, Espanha) para cada 500 mL de água destilada), para tal o sobrenadante foi retirado e descartado e substituído em igual quantidade por Triptona-Sal (Scharlau, Espanha), o *pellet* foi então re-suspendido sendo posteriormente submetido a mais duas outras centrifugações de 5 minutos a 5 °C em uma rotação de 1600 rpm e efectuando-se o mesmo procedimento de lavagem das células.

6.3.4 Preparação das amostras do ensaio *in vitro*

Dois ensaios distintos foram realizados utilizando (1) massa carnea sem condimentação, (2) massa de chouriço. Foram pesados aproximadamente 25 g de massa carnea sem condimentação ou massa de chouriço em sacos esterilizados individuais (n=5), sendo que cada um dos sacos correspondia a um tempo de análise do ensaio (0, 24, 48, 72 e 96 horas). Foram preparadas amostras controlo sem inoculação de *L. innocua* (n=3) onde se determinou a evolução do pH nas massas carnea sem condimentos e de chouriço nos tempos de ensaio 0, 48 e 96 horas. Também foram preparadas amostras sem qualquer isolado inoculado sendo consideradas controlo.

Cada amostra foi inoculada separadamente de acordo com os microrganismos a serem testados.

6.3.5 Inoculação das amostras

Os ensaios de inoculação foram realizados com dois isolados distintos de *Lactobacillus* (*L. plantarum* P3B7 e *L. sakei* CV3C2) sendo testada a sua acção contra *L. innocua* isoladamente ou em conjunto. Assim, de acordo com a Tabela 6.5 estabeleceram-se várias condições de inoculação em estudo com e sem a presença de *L. innocua*.

Tabela 6.5 – Desenho do ensaio de competição/antagonismo com as condições de inoculação .

Inóculos	Código massa	
	cárnea sem condimentação	Código Massa de chouriço
Controlo (sem inóculos)	10	1
<i>L. plantarum</i> P3B7	30	3
<i>L. sakei</i> CV3C2	40	4
<i>L. sakei</i> CV3C2 + <i>L. plantarum</i> P3B7	340	34
<i>L. innocua</i>	20	2
<i>L. plantarum</i> P3B7 + <i>L. innocua</i>	320	32
<i>L. sakei</i> CV3C2 + <i>L. innocua</i>	420	42
<i>L. sakei</i> CV3C2 + <i>L. plantarum</i> P3B7 + <i>L. innocua</i>	3420	342

Foi realizado também um controlo para a massa cárnea sem condimentação ou para a massa de chouriço sem inoculações e outro controlo com inoculação apenas de *L. innocua*. A quantidade total de cada inóculo foi de 1 mL ao total, as quantidades inoculadas de cada microrganismo eram de iguais proporções, contendo aproximadamente 10^5 UFC/mL para 25 g de amostra.

6.3.6 Análise microbiológica

6.3.6.1 Preparação e diluição das amostras

A preparação e diluição das amostras foi realizada de acordo com as recomendações da ISO 6887-1:1999. As amostras de 25 g foram adicionadas de 225 mL de Triptona-Sal (Scharlau, Espanha), originando a Suspensão Mãe (10^{-1}). A homogeneização foi realizada durante aproximadamente 3 minutos em homogeneizador Stomacher (Analytika, Grécia) procedendo-se posteriormente à preparação de diluições decimais seriadas com Triptona-Sal (Scharlau, Espanha).

Ao longo dos dias de análise do ensaio, o número de diluições seriadas foi ajustada e realizada de acordo com o microrganismo a ser quantificado e sua provável concentração na amostra.

6.3.6.2 Contagem de microrganismos aeróbios totais (AT) a 30°C

Foi efectuada uma sementeira por incorporação indirecta de 1 mL das diluições decimais em meio de cultura de TGA agar (Tryptose Glucose Extract Agar, Scharlau, Espanha). Após homogeneização, as placas foram incubadas por um período de 24 a 48 horas à temperatura de 30 °C (ISO 4833:2003). Os resultados finais foram expressos em log ufc/g.

6.3.6.3 Contagem de Bactérias do Ácido Lático (BAL)

Foram inoculadas quantias de 1 mL de diferentes diluições decimais por incorporação indirecta em meio MRS agar (Scharlau, Espanha), suplementado com trifetil tretazol 1 % e acetato de tálio a 5 %. A incubação foi realizada à temperatura de 30 °C por um período de 72 horas (ISO 15214:1998) em ambiente de microaerófilas (GENbox Microaer, bioMérieux, França). A contagem levou em consideração colónias características, que apresentavam uma coloração rosa e rosa lilás, os resultados foram expressos em log ufc/g.

6.3.6.4 Contagem de *Enterobacteriaceae*

Diferentes diluições decimais foram semeadas por incorporação indirecta de 1 mL em meio VRDB agar (Violet Red Bile Dextrose, Scharlau, Espanha). Após homogeneização as placas foram incubadas durante 24 horas à temperatura de 37 °C. As contagens de colónias características (colónias de coloração rósea ou avermelhada púrpura, contendo ou não halos

de precipitações de sais biliares) foram efectuadas (ISO 21528-2:2004), os resultados foram expressos em log ufc/g.

6.3.6.5 Contagem de *Pseudomonas*

Foi-se realizado sementeira por incorporação indirecta de 1 mL das diluições decimais em meio de cultura de *Pseudomonas* (Oxiod, Reino Unido) as placas foram então homogeneizadas e incubadas de 48 a 72 horas em temperatura de 30 °C (ISO 13720:2010). Os resultados das contagens foram expressos em log ufc/g.

6.3.6.6 Contagem de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN)

A partir de diferentes diluições decimais foram semeadas por sementeira direta 0,1 mL em placas contendo meio Mannitol Salt Agar (MSA, Scharlau, Espanha) suplementado com emulsão de gema de ovo estéril (Scharlau, Espanha), o inóculo foi distribuído homogeneamente pela placa com o auxílio de uma alça de Drigalski (hastes plástica em formato de “L”). As placas foram então incubadas a uma temperatura de 30 °C por um período de 48 a 72 horas (Talon *et al.*, 2007a). As colónias que apresentavam halo de coloração amarela foram contadas e os resultados expressos em log ufc/g.

6.3.6.7 Contagem de *Listeria* spp.

A partir das diluições seriadas, foi inoculado 0,1 mL do inóculo em placas contendo meio Agar *Listeria* de Ottaviani & Agosti (ALOA, bioMérieux, França) e com o auxílio de alça de Drigalski o conteúdo foi homogeneamente distribuído pela placa. As placas foram incubadas a uma temperatura de 37 °C por um período de 24 a 48 horas (ISO 11290:1996). As colónias que apresentavam coloração azulada e/ou esverdeada foram contadas e os resultados expressos em log ufc/g.

6.4 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Para avaliar se a matéria prima estava contaminada com *Listeria monocytogenes* realizou-se a pesquisa deste patogénico de acordo com a metodologia descrita na ISO-11290:1996.

O enriquecimento seletivo de 25 g de amostra foi realizado com 225 mL de caldo Frazer I (Scharlau, Espanha), a homogeneização foi efectuada em Stomacher (Analytika, Grécia), com incubou-se a 30 °C durante 24 horas.

Num tubo de ensaio contendo caldo Frazer II (Scharlau, Espanha) inoculou-se 1 mL do primeiro enriquecimento e incubou-se durante 24 horas a 37 °C.

Com o auxílio de uma ansa (10 µL) inoculou-se a segunda suspensão de enriquecimento em placa contendo meio selectivo Oxford (Scharlau, Espanha) e incubou-se a 37 °C durante 24 horas.

As colónias suspeitas de *L. monocytogenes*, (colónias pretas e côncavas) foram repicadas para meio Triptona Soja Agar (TSA, Scharlau, Espanha) e incubadas durante 24 horas a 37 °C.

A placa foi então observada em estereomicroscópio (lupa) e as colónias que apresentaram uma luminescência azul (transiluminação de Henry) foram consideradas suspeitas sendo posteriormente repicadas para identificação.

6.4.1 Identificação de *Listeria monocytogenes* por PCR

Para confirmação e identificação de *L. monocytogenes* a partir de uma cultura de colónias suspeitas repicam-se 10 colónias. O isolamento foi realizado por estria em placa contendo meio seletivo ALOA (bioMérieux, França) com incubação a 37 °C durante 24 horas. As colónias selecionadas foram identificadas como C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 e C10.

Para posterior obtenção de cultura bacteriana foram utilizadas placas de TSA (Scharlau, Espanha) inoculadas com o auxílio de uma ansa (10 µL) e incubadas a 37 °C durante 24 horas.

6.4.2 Extração de DNA pelo método de guanidina

A extração de DNA foi realizada pelo método do tiocianato de guanidina (Pitcher *et al.*, 1989). A partir de cultura bacteriana procedeu-se à extração do DNA genómico para o microrganismo isolado. Com o auxílio de uma ansa (10 µL) suspendeu-se uma quantidade correspondente a 2 a 3 ansadas da cultura bacteriana em 1 mL de TE 1x (10mM Tris, 1 mM EDTA) em *eppendorf*, após homogeneização em vortex realizou-se uma centrifugação (18.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C) (Eppendorf 5415R, Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante foi desprezado e efectuou-se a re-suspensão do *pellet* em 250 µL de TE 1x com lisozima (10 mg / mL a 20 °C negativos) incubando-se em banho de água à temperatura de 37 °C por 2 horas.

Após a obtenção da lise das células adicionou-se 250 µL de GES (5 M tiocianato de guanidina, 0,1 M de EDTA e 0,5 % (w/v) sarcosil) agitou-se por inversão e incubou-se em gelo durante 10 minutos. Adicionou-se 125 µL de acetato de amónio (10 M) e novamente incubou-se em gelo por 10 minutos. Após esta incubação foi adicionado 500 µL da mistura de clorofórmio / álcool amílico (24:1), agitou-se por inversão e centrifugou-se (18.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C). O sobrenadante foi transferido para novo *eppendorf* e o restante foi descartado.

No *eppendorf* contendo o sobrenadante foi adicionado 500 µL de isopropano e misturado por inversão, em seguida foi centrifugado (18.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C). O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1 mL de etanol a 70 % efectuando-se nova centrifugação (18.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C). Desprezado o sobrenadante, os *eppendorfs* foram deixados de maneira invertida para que o conteúdo secasse, após a secagem adicionou-se 150 µL de TE 1x, sendo armazenados em câmara fria a 4 °C.

6.4.3 Método de identificação de *L. monocytogenes* por PCR

A identificação da espécie foi realizada por métodos moleculares de reações de polimerase em cadeia (PCR) (Talon *et al.*, 2007a; Simon *et al.*, 1996). O controlo positivo utilizado foi *L. monocytogenes* CECT 934. As condições da reação, reagentes e suas concentrações estão descritas na Tabela 6.6. (Talon *et al.*, 2007a). O PCR foi realizado em termociclador (Doppio, VWR®).

Tabela 6.6 – Condições da reacção PCR para identificação de *Listeria monocytogenes*. Fonte: Adaptado de Talon *et al.*, 2007a; Simon *et al.*, 1996.

Sequência do Primer			Programa do PCR
Fragmento Amplificado	274 bp	LIP1 50-GATACAGAAACATCGGTTGGC	P: 94 °C 2 min. 40 ciclos: D: 94 °C 0.30 seg. A: 55 °C 0.30 seg. E: 74 °C 1 min. IF: 74 °C 5 min.
		LIP2 50-GTGTAACCTTGATGCCATCAGG	
Gene Alvo	<i>prfA</i>		

Legenda: P – Pré-incubação; D – Desnaturação; A: *Anneling*; E – Extensão; IF – Incubação final.

6.4.4 Condições de eletroforese para os produtos PCR amplificados

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5 % (w/v, Lonza, EUA) em TBE 1 X, a 90 V com uma duração de 50 min.

Para melhor comparação entre os fragmentos utilizou-se o marcador NzyDNA ladder V (Nzytech, Portugal), a revelação do gel foi feita em num transiluminador de UV (ImageMaster, Pharmacia Biotech, Suécia).

6.5 Determinação do pH

A avaliação do pH foi realizada nos períodos de 0, 48 e 96 horas, com o auxílio de um potenciómetro de pH (Hanna Instruments, Portugal) em duplicado (Norma Portuguesa 3441: 2008). As amostras avaliadas consistiram em amostras em que a inoculação de *L. innocua* não ocorreu, apenas as amostras de controlo e inoculadas com *Lactobacillus* foram avaliadas.

6.6 Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva dos resultados, recorrendo ao programa Microsoft Office Excell 2013, no qual se obtiveram a média e desvio padrão das variáveis analisadas e tendo-se efectuado a sua representação gráfica.

O programa SPSS Statistics 22.0 para Windows, no qual se realizou uma análise de variância factorial (ANOVA) avaliando-se o efeito das estirpes inoculadas para cada dia de análise e do tempo de maturação, com um grau de confiança de 95 %. Quando o teste F da ANOVA foi significativo, recorreu-se ao teste Tukey para comparação múltipla das médias.

Efectuou-se também o cálculo do diferencial de crescimento e da taxa de crescimento entre dois tempos de ensaio, efectuando-se no primeiro caso a diferença entre os valores obtidos na contagem de microrganismos em log UFC g⁻¹ (Δy) em dois pontos de análise nos tempos a e b, enquanto para a taxa calculou-se a relação através da equação $\Delta y_{a-b} / \Delta T_{a-b}$, na qual ΔT_{a-b} é a diferença de tempo em dias entre tempos a e b (0 – 2 dias equivalente ao período 0 - 48 horas, 2 - 3 dias equivalente a 48 – 72 horas e 0 - 4 dias equivalente a 0 – 96 horas).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Caracterização da capacidade inibitória dos isolados de *Lactobacillus* em estudo

7.1.1 Avaliação do potencial bacteriocinogénico

Todas as estirpes estudadas, *L. plantarum* (P3B7 e P05-15) e *L. sakei* (CV3C2), apresentaram uma potencial capacidade bacteriogénica para com os microrganismos patogénicos testados (*L. monocytogenes* (CECT 934), A41, AS1, 11S, 131, 18S4, *L. innocua* (CECT 910T), *Salmonella enteridis* (CECT 4300), *S. aureus* (ATCC 29213), *Enterococcus avium* (EA5) e *Escherichia coli* (CCUG 42744) tal como se observa nas Figuras Figura 7.1, Figura 7.2 e Figura 7.3 e nos Apêndices A e B. Dentre estes, o isolado *L. plantarum* P3B7 apresentou os maiores halos de inibição seguido pela *L. plantarum* P05-15 e *L. sakei* CV3C2 para qualquer um dos indicadores utilizados Gram positivos e Gram negativos.

A Figura 7.1 demonstra os halos de inibição para com os microrganismos deteriorativos e tecnológicos testados.

Dentre a microbiota deteriorativa, a estirpe *Enterococcus avium* foi a que apresentou menor susceptibilidade às estirpes de *Lactobacillus*, sendo que os halos de inibição foram maiores para as estirpes P3B7 e P05-15 (2,93 e 2,83 cm respectivamente), em comparação com a estirpe *L. sakei* CV3C2 (1,58 cm). Já a estirpe de *E. coli* demonstrou uma alta susceptibilidade ao potencial de actividade bacteriogénica das estirpes de *Lactobacillus* P3B7, P05-15 e CV3C2, que apresentaram halos de 4,13, 3,95 e 3,38 cm respectivamente, seguida pelas estirpes de *S. enteridis* (4,33, 4,00 e 2,88 cm respectivamente) e *P. aeruginosas* (4,73, 3,98 e 2,28 cm respectivamente).

A microbiota tecnológica, exemplificada neste estudo com as estirpes *S. equorum* e *S. xylosus*, foram inibidas pelas três estirpes de *Lactobacillus*, sendo que a estirpe CV3C2 demonstrou menor capacidade inibitória para estas estirpes (halos de 0,2 e 1,6 cm respectivamente).

As estirpes de *L. plantarum*, P3B7 e P05-15 respectivamente, apresentaram um maior potencial de inibição para com os microrganismos que constituem a microbiota deteriorativa, como *P. aeruginosa* (4,73 – 3,98 cm) e *B. thermosphacta* (4,40 – 3,73 cm), em comparação com a estirpe de *L. sakei* (CV3C2). Apesar de as estirpes de *L. plantarum* (P3B7 e P05-15) apresentarem um maior potencial bacteriogénico para a microbiota deteriorativa, também apresentaram um maior poder de inibição contra a microbiota tecnológica, mas apenas a estirpe P3B7 mostrou ser significativamente diferente das outras duas estirpes em estudo ($p < 0,05$) na inibição de *S. equorum*.

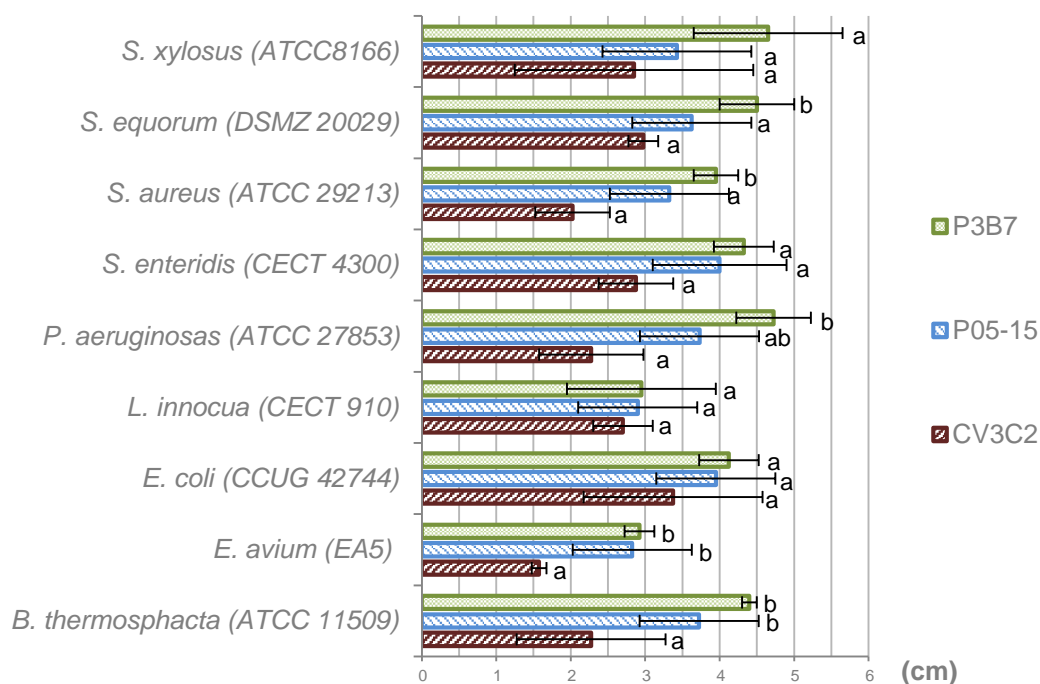


Figura 7.1 – Halos de inibição dos microrganismos deteriorativos e tecnológicos testados.
 Legenda: dv – Desvio padrão. ab – médias com letras diferentes são significativamente diferentes.

O microrganismo patogénico que apresentou maior inibição foi *L. monocytogenes* 131 (halos entre 3,75 – 4,32 cm) enquanto o que apresentou a menor inibição foi *L. monocytogenes* (CECT 343) (halos entre 1,85 – 2,85 cm), como mostra a Figura 7.2.

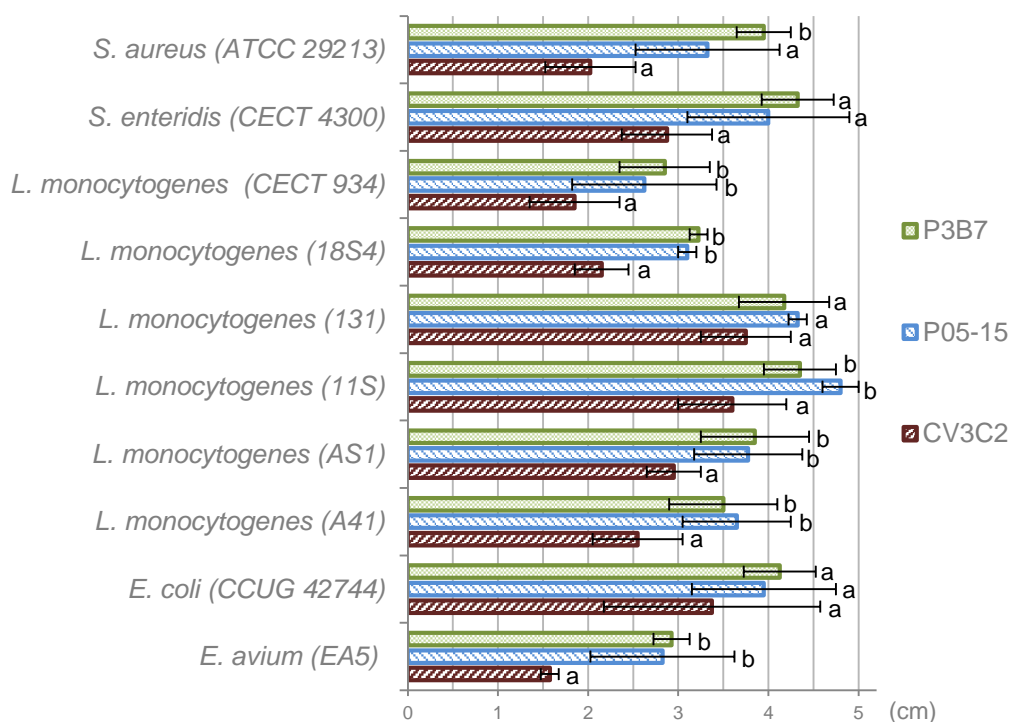


Figura 7.2– Halos de inibição dos microrganismos patogénicos testados.
 Legenda: dv – Desvio padrão. ab – médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes.

Na inibição de microrganismos patogénicos, as estirpes de *L. plantarum* (P3B7 e P05-15) mostraram-se ser mais eficientes em comparação com a estirpe de *L. sakei* (CV3C2), que apresentou halos de inibição menores para todas as estirpes patogénicas testadas, valores entre 1,85 e 3,75 cm em comparação com valores entre 2,85 – 2,63 cm e 4,35 – 4,80 cm para P3B7 e P05-15 respectivamente.

Todas as estirpes de *Lactobacillus* apresentaram potencial bacteriogénico contra as estirpes de *Listeria* sp.. As estirpes selvagens (A41, AS1, 11S, 131 e 18S4) apresentaram maior susceptibilidade em comparação com as estirpes de referência de *L. monocytogenes* (CECT 934) e *L. innocua* (CECT 910), como demonstra a Figura 7.3.

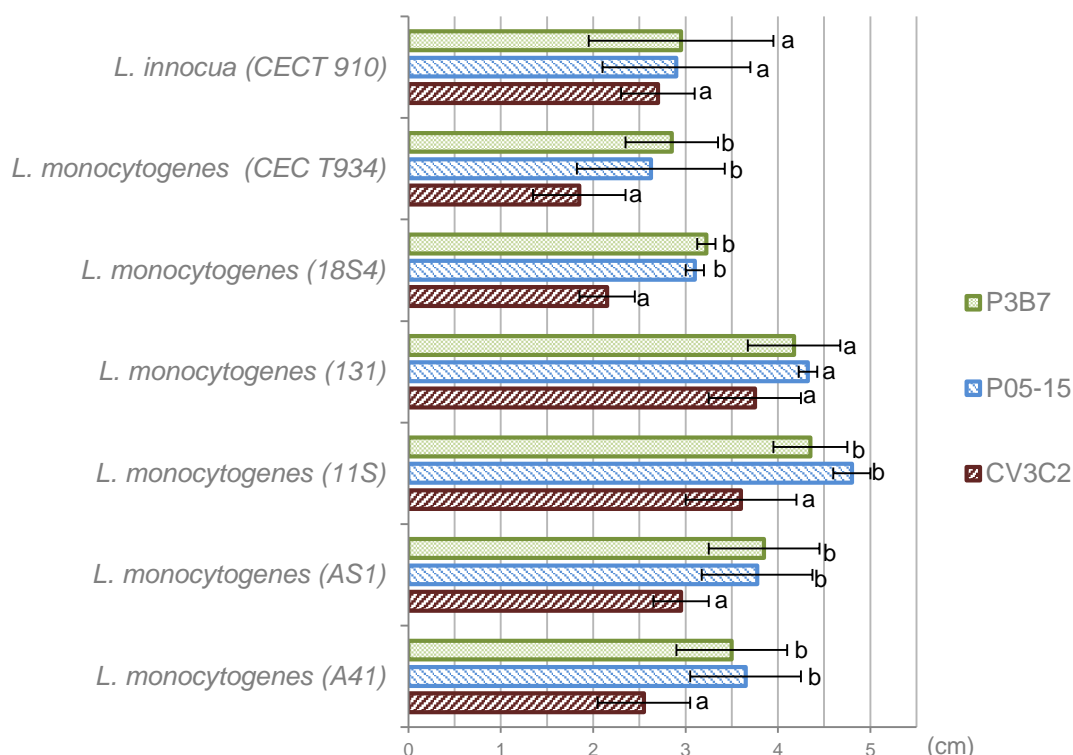


Figura 7.3 – Halos de inibição das estirpes de *L. innocua* de referência e *L. monocytogenes* de referência e selvagens.

Legenda: dv – Desvio padrão. ab – médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes.

Os isolados em estudo mostraram capacidades inibitórias quer para microrganismos Gram positivos quer para Gram negativos, constituindo estes indicadores de higiene e deterioração, assim como microrganismos patogénicos. As estirpes de *L. plantarum* (P3B7 e P05-15) apresentaram maior potencial de inibição em comparação com a estirpe de *L. sakei* (CV3C2), sendo que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores obtidos pelas duas estirpes de *L. plantarum*.

A produção de bacteriocinas por estirpes de *L. plantarum* e *L. sakei* é amplamente discutidas em literatura (Carvalho *et al.*, 2010; Leroy & Vuyst, 2003; Todorov, 2009). Bacteriocinas podem possuir um menor espectro de actuação, inibindo microrganismos semelhantes ao produtor (Riley & Wertz, 2002), outras podem possuir um amplo espectro de actuação inibindo microrganismos tanto Gram positivos como Gram negativos (Cotter *et al.*,

2005), a sua actuação depende do microrganismos produtor (Montville & Chen, 1998). Entretanto os halos de inibição não são característicos apenas pela actuação dos péptidos, outros factores como a produção de ácidos orgânicos e outros compostos também tem influência na inibição dos microrganismos.

Todorov e colaboradores (2012) obtiveram resultados positivos na inibição de microrganismos como *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Pseudomonas* spp. e *S. aureus* com a utilização de uma estirpe de *L. sakei* produtora de bacteriocina, entretanto não houve inibição para microrganismos como *P. aeruginosas* e *Salmonella* sp. (Todorov *et al.*, 2012).

Abo-Amer (2007) estudou estirpes de *L. plantarum* as quais possuíam um amplo espectro de inibição, atuando contra Gram positivos e negativos, inibindo microrganismos como *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosas*, *E. coli* e *L. monocytogenes* (Abo-Amer, 2007). Resultados próximos também foram descritos por Smaoui e colaboradores (2010), onde estirpes de *L. plantarum* também inibiram microrganismos como *S. aureus* e *Fusarium* sp. (Smaoui *et al.*, 2010). Schillinger & Lücke (1989) testaram três estirpes de *L. plantarum* isolados de carnes, onde apenas duas apresentaram inibição contra *L. monocytogenes* (Schillinger & Lücke, 1989). Anas e colaboradores (2008) estudaram diferentes estirpes de *Lactobacillus sakei* e *plantarum* em ensaios de antagonismo, onde ambos os isolados demonstraram potencial bacteriocinogénico contra *S. aureus* (Anas *et al.*, 2008).

Tendo em consideração que das três estirpes disponíveis duas constituem a espécie *L. plantarum*, e que estas apresentaram potenciais bacteriogénicos semelhantes, optou-se pela utilização da estirpe de *L. sakei* (CV3C2) e apenas uma das duas estirpes de *L. plantarum*. Conconcelli (2007) descreve que dentre as bactérias mais utilizadas para integrar culturas *starter L. sakei* possui funções de acidificação, atividade catalítica, desenvolvimento de sabor, metabolismo de aminoácidos, propriedades antioxidantes e produção de bacteriocina, e *L. plantarum* possui funções de acidificação, propriedades antioxidantes e produção de bacteriocina (Conconcelli, 2007).

A inibição de microrganismos patogénicos foi maior para as duas estirpes de *L. plantarum* P3B7 e P05-15, com pequenas diferenças nos tamanhos dos halos (médias de 3,78 e 3,70 cm respectivamente). Dentre a microbiota deteriorativa a estirpe P3B7 apresentou um potencial de inibição maior em relação às outras duas estirpes, entretanto também apresentou os maiores halos de inibição para com outras estirpes de uso tecnológico. Em relação às estirpes de *L. monocytogenes*, a estirpe P3B7 apresentou o maior potencial de inibição para com as estirpes de referência, enquanto os valores para as estirpes selvagens foram pouco inferiores em relação à estirpe P05-15 (médias de 3,82 e 3,93 cm respectivamente).

A estirpe escolhida de *L. plantarum* para ser utilizada no ensaio *in vitro* foi a P3B7, a qual apresentou não somente potencial bacteriogénico desejável contra *L. monocytogenes* (de referência e selvagens), mas também para a microbiota deteriorativa. Apesar dos valores entre P3B7 e P05-15 serem próximos, uma diferença significativa desejável pode ser notada para com o microrganismo *S. aureus*, e uma indesejável para com *S. equorum*.

7.1.2 Determinação da produção de L(+) e D(-) ácido láctico

Os resultados obtidos para as estirpes em testes e estirpes de referências e a relação estabelecida entre a produção de L(+) e D(-) ácido láctico, estão descritos na Tabela 7.1.

Tabela 7.1 – Resultados da quantificação da produção de L(+) e D(-) ácido láctico.

	L(+) ácido láctico (g/L)	D(-) ácido láctico (g/L)	Relação L(+)/D(-)
<i>L. plantarum</i> P05-15	0,165	0,248	2:3
<i>L. plantarum</i> P3B7	0,132	0,216	5:8
<i>L. sakei</i> CV3C2	0,145	0,237	5:8
<i>L. plantarum</i> CECT 220	0,158	0,237	2:3
<i>L. sakei</i> ATCC 15323	0,201	0,143	7:5
<i>S. xylosus</i> ATCC 8166	0,012	0,010	-
Solução Padrão (D(-)/L(+) ácido láctico)*	0,120	0,138	-

Legenda: *Solução Padrão de D(-) ácido láctico contém 0,5 – 30 µg de D(-) ácido láctico em 0,10 – 1,5 mL, Solução Padrão de L(+) ácido láctico contém 0,3 – 30 µg de L(+) ácido láctico em 0,10 – 1,5 mL.

A maior produtora de ácido das três estirpes em estudo foi a estirpe *L. plantarum* P05-15 a qual apresenta valores mais próximos dos da estirpe de referência *L. plantarum* CECT 220, para a produção de D(-)/L(+) ácido láctico. A estirpe *L. plantarum* P3B7, apesar de apresentar menores valores de L(+) e D(-) ácido láctico, apresenta um relação entre a produção de L(+)/D(-) ácido láctico semelhante às estirpe *L. sakei* CV3C2 e *L. plantarum* CECT 220. Os valores de produção de D(-) e L(+) ácido láctico foram próximos para as duas estirpes de *L. plantarum*, sendo que a estirpe P3B7 apresentou uma produção levemente menor de ambos os ácidos.

O isolado *L. sakei* CV3C2 apresentou uma produção de D(-) ácido láctico superior e inferior de L(+) ácido láctico em relação a estirpe de referência *L. sakei* ATCC 15323.

No presente estudo, os valores observados para a produção de D(-) ácido láctico são superiores à produção de L(+) ácido láctico nas três estirpes testadas, com inoculações em meio MRS caldo (Scharlau, Espanha) e incubadas 24 horas a 30 °C. A produção de quantidades maiores de D(-) ácido láctico em comparação com as quantidades de L(+) ácido láctico são também descritas em literatura. Trontel e colaboradores (2011) utilizaram culturas contendo diferente estirpes de *Lactobacillus* sp., com 24 horas de incubação e obtiveram resultados para a produção de D(-) ácido láctico entre 0,926 - 0,887 g/L e para L(+) ácido láctico entre 0,074 – 0,113 g/L, em diferentes substratos (glucose e sacarose respectivamente) (Trontel *et al.*, 2011).

Outros estudos apresentam valores maiores para a produção de L(+) ácido láctico. Sawitzki *et al.* (2008) utilizaram estirpes de *L. plantarum* e apontam uma produção de 0,010 g/L e entre 0,209 – 0,058 g/L para D(-) ácido láctico e de 0,841 g/L e entre 0,393 – 0,115 g/L para L(+) ácido láctico, para estirpes de referência e selvagens isoladas de produtos cárneos fermentados, respectivamente.

Diferentes microrganismos apresentam maior ou menor sensibilidade para os diferentes isômeros do ácido láctico. Gravesen e colaboradores (2004) relataram seu estudo que *L. monocytogenes* apresentou uma sensibilidade levemente maior para D(-) ácido láctico, mas ambos os isômeros possuem um mesmo poder de penetração na membrana celular

(Gravesen *et al.*, 2004). Estudos de Leitch & Stewart (2002) apontam que *E. coli* O157:H7 isoladas de carcaças de animais apresentam uma maior susceptibilidade ao L(+) ácido láctico (Leitch & Stewart, 2002).

Face aos três isolados avaliados, as estirpes de *L. plantarum* P3B7 e *L. sakei* CV3C2 demonstram resultados mais adequados, apresentando uma relação de produção de L(+)/D(-) de 5:8, em comparação com a estirpe P05-15 (2:3). A menor produção de D(-) ácido láctico é desejável em termos nutricionais, uma vez que a sua quebra pelo organismo humano é dispendiosa (em relação ao L(+) ácido láctico), apesar de a sua presença estar ligada à inibição de microrganismos como a *L. monocytogenes* (Gravesen *et al.*, 2004).

Há um efeito conjugado entre a produção de ácido e o potencial de inibição dos isolados testados. Pode-se estabelecer uma relação entre a produção de ácido e os halos de inibição obtidos na avaliação do potencial bacteriocinogénico, uma vez que ambas as estirpes de *L. plantarum* apresentaram a maior produção de ácido também apresentaram os maiores halos de inibição.

7.2 Ensaio de competição/antagonismo *in vitro*

7.2.1 Caracterização da matéria prima utilizada nos ensaios *in vitro*

Os resultados dos parâmetros analisados na matéria prima estão descritos na Tabela 7.2.

Tabela 7.2 – Parâmetros analisados na matéria prima apresentados em \log^{10} UFC g⁻¹.

Parâmetro	Média (n=3)	Desvio Padrão
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,6	2,8
Aeróbios totais a 30 °C	3,0	0,0
<i>Pseudomonas</i>	1,0	1,7
Bactérias do ácido lácticas	1,3	0,5
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	1,6	1,5
<i>Listeria</i> spp.	< 1	0,0

Na avaliação microbiológica da matéria prima verificou-se que apenas a contagem de microrganismos AT a 30 °C foi de 3 \log^{10} UFC g⁻¹, foi superior a todos os outros parâmetros analisados. Estes valores são semelhantes aos encontrados por Mano e colaboradores (2002) que relataram contagens iniciais de AT a 30 °C de aproximadamente 2 \log^{10} UFC g⁻¹ em carne suína, armazenada em aerobiose a temperaturas de 1 e 7 °C (Mano *et al.*, 2002). Calderon & Furlanneto (1990) e Fuzihara & Franco (1993) relataram contagens de AT a 30 °C na ordem dos 4 a 7 \log^{10} ufc g⁻¹ em diferentes amostras de carne suínas (Calderon & Furlanneto, 1990; Fuzihara & Franco, 1993).

Os teores de *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae* na matéria prima foram baixos (1,0 e 1,6 \log^{10} UFC g⁻¹) indicando uma baixa contaminação cruzada. Bruckner e colaboradores (2012) e Nieminen e colaboradores (2011) referem valores mais elevados de *Enterobacteriaceae* na ordem de 4,1 a 4,9 \log^{10} UFC g⁻¹ mas em carne picada, o que pressupõe

a existência de maior manipulação e modificação do seu potencial óxido-redutor pelo processo de picagem facilitando assim a multiplicação microbiana (Bruckner *et al.*, 2012; Nieminen *et al.*, 2011).

No presente estudo, a microbiota tecnológica, representada pela contagem de BAL e SCN foi de 1,3 e 1,7 log¹⁰ UFC g⁻¹ respectivamente. Atanassova e colaboradores (2001) apresentaram resultados de contagem de BAL em carne suína crua entre 2 e 4 log¹⁰ UFC g⁻¹. Estes microrganismos estão naturalmente presentes na carne por contaminações que ocorrem quer durante o processo de abate dos animais quer durante a sua desmancha (Atanassova *et al.*, 2001).

Não se enumeraram colónias de *Listeria* spp. na matéria prima no dia da sua recepção. Alguns países como os EUA praticam tolerância zero quanto à presença de *L. monocytogenes* em alimentos (Warriner & Namvak, 2009). O Regulamento nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicados a alimentos apenas especifica a presença de *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo, sendo aceite 100 UFC g⁻¹ para produtos colocados em mercado durante a sua vida útil, contanto que estes não sejam consumidos por indivíduos que façam parte de grupos de risco.

No âmbito da caracterização da matéria prima utilizada nos ensaios *in vitro* pode-se afirmar que a matéria prima utilizada estava efectivamente em condições sanitárias satisfatórias de acordo com os critérios de higiene expressos no Regulamento nº 2073/2005.

Contudo sabe-se que *L. monocytogenes* pode estar presente em carnes cruas (Thévenot *et al.*, 2006) e para isso técnicas de detecção podem ser utilizadas (Andrade *et al.*, 2010). Assim, foi realizada uma pesquisa de *L. monocytogenes* na matéria prima tendo sido confirmada a sua presença em 25 g de amostra com identificação por PCR. O gel de agarose (Figura 7.4) fornece a confirmação de que as colónias suspeitas isoladas pertenciam à espécie *L. monocytogenes*.

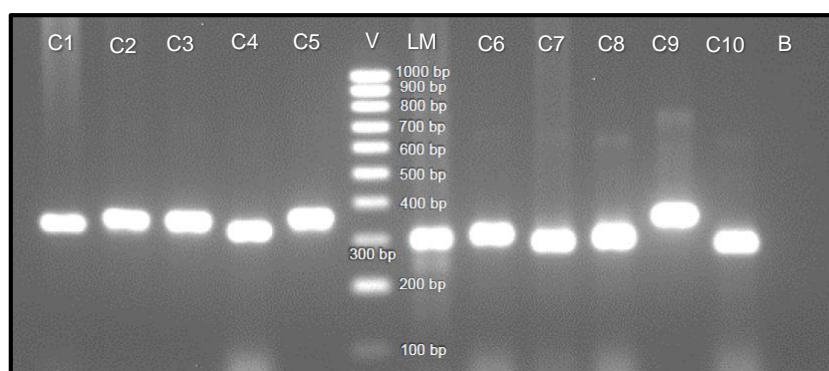


Figura 7.4 – Gel de agarose, produtos obtidos da utilização do PCR específico para *L. monocytogenes*. Legenda: V - marcador NzyDNA ladder V (Nzytech®), LM – *L. monocytogenes* CECT 934, B – Branco.

A presença de *L. monocytogenes* em carnes cruas é referenciada em literatura (Lake *et al.*, 2002; Moreno, 2013; Pociecha, 1990; Thévenot *et al.*, 2006). A presença em carcaças de suínos é descrita com uma frequência de 0,7 a 4,1 % (Gamboa-Marin *et al.*, 2012; Hellstrom *et al.*, 2010; Kunuganti *et al.*, 2002; Yeh *et al.*, 2005) sendo a sua frequência superior para carnes cruas provenientes de mercados. Minami e colaboradores (2010) descreveram valores

inferiores a 6 %, mas Indrawattana e colaboradores (2011) reportaram valores de 15,4 % (Indrawattana *et al.*, 2011; Minami *et al.*, 2010).

7.2.2 Evolução da microbiota em massa de carne sem condimentação inoculada com *Lactobacillus*

Nos ensaios em que a matriz foi a carne sem condimentação, onde foram efectuadas inoculações de isolados de *Lactobacillus* e *L. innocua*, a evolução dos parâmetros microbiológicos estudados nas duas fases de fabrico mimetizadas (7 °C e 20 °C) está representada nas Figuras Figura 7.5, Figura 7.6, Figura 7.7 e no Apêndice C.

Os microrganismos AT a 30 °C (Figura 7.5 a), grupo indicador de contaminação geral, estavam inicialmente (0 horas) presentes com valores de 3,25, 5,88 log¹⁰ UFC g⁻¹ e 5,51 - 6,56 log¹⁰ UFC g⁻¹ respectivamente para as amostras controlo (10), amostra 20, inoculada apenas com *L. innocua* e todas as outras amostras onde foram inoculados *Lactobacillus*. Todas as amostras inoculadas apresentaram valores iniciais mais elevados de microrganismos AT a 30 °C, uma vez que o meio de cultura utilizado permite o crescimento de *L. innocua* e *Lactobacillus* englobando-se a sua contagem no grupo dos microrganismos aeróbio totais a 30 °C.

Ao longo das 48 horas a 7 °C as amostras inoculadas com *Lactobacillus* e/ou *L. innocua* tiveram uma evolução semelhante. Enquanto a amostra controlo apresentou um aumento da contagem de AT de 3 a 4 log¹⁰ UFC g⁻¹ durante as 48 horas de ensaio a 7 °C aproximando-se das contagens da amostra 3420 (inoculada com *Lactobacillus* e *Listeria*). Ercolini e colaboradores (2009) também descrevem teores de 5 a 6 log¹⁰ UFC g⁻¹, em carnes refrigeradas (7 °C), após dez dias de incubação para a contagem de AT (Ercolini *et al.*, 2009).

A carne sem condimentos registou um aumento para 7 e 8 log¹⁰ UFC g⁻¹ de AT às 96 horas de ensaio. Este facto deve-se especialmente à diferença nas temperaturas dos períodos em estudo, de 7 °C para 20 °C com promoção da multiplicação da microbiota presente na carne. Logo a partir das 72 horas o valor das contagens de AT a 30°C em todas as amostras foi semelhante.

Nas condições em estudo, observaram-se diferenças significativas na contagem de *Pseudomonas* (Figura 7.5 b) às 0 horas. A carne (controlo) apresentou contagens semelhantes ($p>0,05$) às amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus* (30, 40 e 340) e à amostra 320 (inoculada com P3B7 + *L. innocua*). Enquanto as amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus* apresentaram contagens de *Pseudomonas* de 2 a 3 log¹⁰ UFC g⁻¹, os teores deste parâmetro foi de 5 log¹⁰ UFC g⁻¹ nas amostras inoculadas com *Listeria*. Contudo, logo às 24 horas a 7 °C, observou-se que os teores de *Pseudomonas* se aproximaram nas várias amostras, ocorrendo a sua multiplicação ao longo do ensaio e atingindo teores semelhantes de 8 e 9 log¹⁰ UFC g⁻¹ às 96 horas a 20 °C .

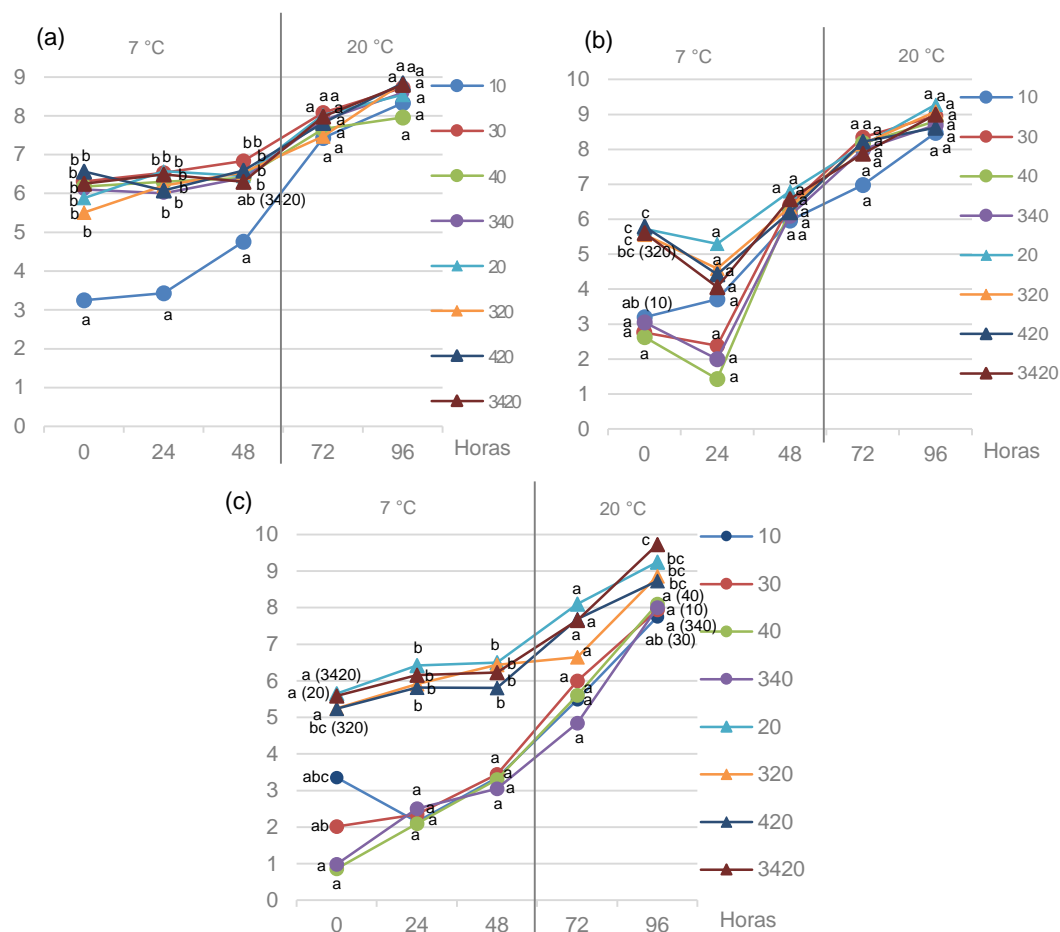


Figura 7.5 – Efeitos das diferentes condições de inoculação numa matriz cárnea sem condimentações armazenada em dois estágios de temperatura ao longo do tempo (horas) nos parâmetros microbiológicos analisados (\log_{10} UFC g^{-1}).

Legenda: (a) – Contagem de microrganismos AT a 30 °C; (b) – Contagem de *Pseudomonas*; (c) – Contagem de *Enterobacteriaceae*; ab – letras diferentes para o mesmo dia correspondem a médias significativamente diferentes. (●) amostras sem inoculação de *L. innocua*; (▲) amostras com inoculação de *L. innocua*. Códigos e inoculações – 10: Carne sem inoculações; 20: *L. innocua*; 30: *L. plantarum* P3B7; 40: *L. sakei* CV3C2; 320: *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*; 340: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7; 420: *L. sakei* CV3C2 + *L. innocua*; 3420: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*.

Caldara e colaboradores (2014) relataram em carne de suíno teores iniciais de *Pseudomonas* de 0,51 \log_{10} UFC g^{-1} aumentando para 4,35 \log_{10} UFC g^{-1} , após 10 dias em refrigeração a 7 °C (Caldara *et al.*, 2014). Também Saraiva (2008) descreve para a carne suína, sob refrigeração (4 °C) valores iniciais de 1,45 \log_{10} UFC g^{-1} e ao final de 5 dias de ensaio valores de 5,01 \log_{10} UFC g^{-1} . *Pseudomonas* são microrganismos psicrotróficos que se multiplicam rapidamente em temperaturas de refrigeração da carne (Ray, 2005).

Nos estudos de antagonismo/competição realizados por Katikou e colaboradores (2005) com carne embalada a vácuo e refrigerada, utilizando *L. sakei* e a conjugação de *L. sakei* com *L. curvatus*, as contagens iniciais de *Pseudomonas* foram de 3 \log_{10} UFC g^{-1} para todas as amostras. Ao fim de 28 dias de armazenamento a 4 °C os valores de *Pseudomonas* aumentaram para 6 \log_{10} UFC g^{-1} em ambas as combinações mas significativamente diferentes do teores apresentados pelo controle (7,82 \log_{10} UFC g^{-1}) (Katikou *et al.*, 2005).

A contagem de *Pseudomonas* nas amostras do ensaio foi maior que a obtida na caracterização da matéria prima e e que os valores habitualmente descritos na literatura, podendo ser resultantes da manipulação que ocorreu na preparação das amostras. No presente estudo não se observou inibição da multiplicação de *Pseudomonas*, uma vez que ao final das 96 horas as amostras inoculadas não apresentaram valores inferiores ao controlo.

A amostra controlo apresentou valores iniciais de $3,36 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$ para *Enterobacteriaceae* (Figura 7.5 c) e valores finais de $7,75 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$, após estar submetida a 7 °C e 20 °C. As amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus* apresentaram valores iniciais semelhantes ($p>0,05$) de 2,02, 0,86 e 0,98 $\log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$ para as amostras 30 (P3B7), 40 (CV3C2) e 340 (P3B7 + CV3C2) respectivamente.

As amostras que continham *L. innocua* (20, 320, 420 e 3420) apresentaram valores de *Enterobacteriaceae* próximos de $5 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$ no início dos ensaios.

Às 48 horas de ensaio, a temperatura de 7 °C que mimetizam a fase de maturação de produtos fermentados, as amostras em que *L. innocua* foi inoculada apresentaram sempre contagens de *Enterobacteriaceae* superiores ($p<0,05$) às obtidas das amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus* e controlo.

Ao final das 96 horas de ensaio a amostra controlo ($7,75 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$) apresentou diferença significativa ($p<0,05$) apenas para as amostras 20 e 3420, ambas com teores de 9 $\log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$. A amostra 3420 foi semelhante a amostras inocuadas com *L. innocua*, mas foi significativamente diferente das amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus* (30, 40 e 320). Apesar de não existirem diferenças entre as amostras no fim das 96 horas de ensaio, observa-se que nas amostras inoculadas com *Listeria* o incremento da multiplicação microbiana é menor o que poderá ser explicado pela competição intrínseca entre espécies (Carvalheira *et al.*, 2010).

O *International Commission for Microbial Specifications in Food* (ICMSF, 1983) determinou que a presença de *Enterobacteriaceae* em valores superiores a $7 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$ indicam uma avançada deterioração do alimento. Katikou e colaboradores (2005), observaram que utilizando *L. sakei* numa carne embalada a vácuo e refrigerada à 4 °C, os valores iniciais de *Enterobacteriaceae* eram de $1 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$, aos 7 dias de ensaio os valores eram inferiores a $3 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$ e apenas ao final de 28 dias os valores subiram para $4 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$ (Katikou *et al.*, 2005).

A amostra 3420, que compõem uma conjugação de ambos os isolados de *Lactobacillus* (P3B7 + CV3C2) e *L. innocua*, apresentou o maior valor final de *Enterobacteriaceae* de entre todas as amostras ($9,73 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$), indicando que a conjugação das duas estirpes não é ideal para a inibição deste grupo de bactérias deteriorativas.

Todas as amostras inoculadas com *L. innocua* apresentaram valores iniciais de *Enterobacteriaceae* mais elevados, uma vez que o meio de cultura não foi suficientemente selectivo para a inibição deste microrganismo.

Os valores iniciais para a contagem de SCN (Figura 7.6 a) na amostra controlo foram de $1,86 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$, observando-se o seu acréscimo ao longo dos períodos de armazenamento a 7°C e a 20°C ($5,73 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$).

As amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus* (30, 40 e 340) apresentaram contagens de SCN de $2 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$, às 0 horas, semelhantes ao controlo mas significativamente diferentes ($4 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$) das contagens obtidas nas amostras inoculadas com *L. innocua* (320, 420 e 3420). Estes valores reflectem a incapacidade de seletividade do meio, uma vez que apenas as amostras inoculadas com *L. innocua* apresentaram valores superiores às amostras sem *L. innocua*.

Ao fim das 72 horas, quando as amostras completaram 24 horas a 20°C , não houve diferença significativa nas contagens de SCN com valores finais (96 horas) de $7 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$.

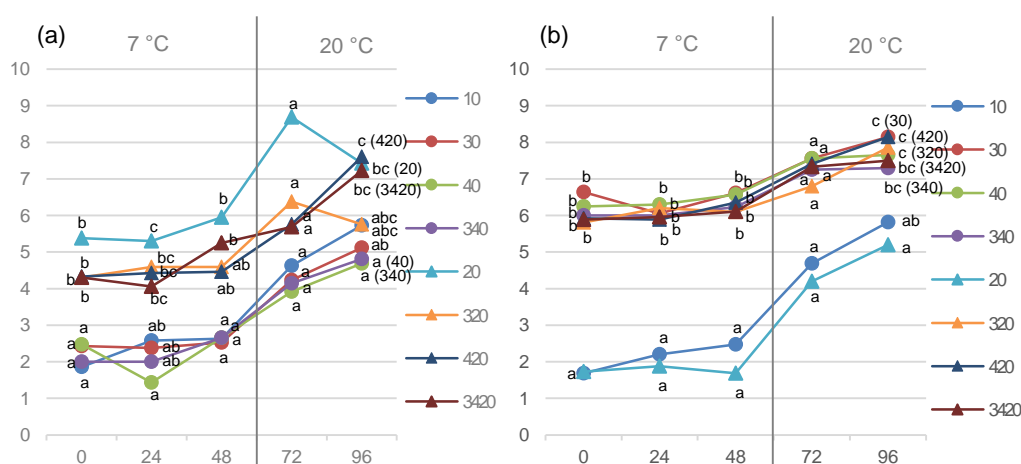


Figura 7.6 – Efeitos das diferentes condições de inoculação numa matriz cárnea sem condimentações armazenada em dois estágios de temperatura ao longo do tempo (horas) nos parâmetros microbiológicos analisados ($\log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$).

Legenda: (a) – Contagem de *Staphylococcus coagulase negativo*; (b) – Contagem da microbiota ácido láctica; ab – letras diferentes para o mesmo dia correspondem a médias significativamente diferentes. (●) amostras sem inoculação de *L. innocua*; (▲) amostras com inoculação de *L. innocua*. Códigos e inoculações – 10: Carne sem inoculações; 20: *L. innocua*; 30: *L. plantarum* P3B7; 40: *L. sakei* CV3C2; 320: *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*; 340: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7; 420: *L. sakei* CV3C2 + *L. innocua*; 3420: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*.

SCN fazem parte da microbiota tecnológica de produtos cárneos fermentados, e a sua presença é amplamente descrita não só em produtos cárneos mas também em carnes cruas (Lebert *et al.*, 2007a; Talon *et al.*, 2007b). Goja e colaboradores (2013) descrevem a presença de SCN em valores de $3 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$ em carnes frescas, onde *S. xylosus* foi isolado (Goja *et al.*, 2013). Simonová e colaboradores (2006) obtiveram valores de SCN entre 5 e $6 \log^{10} \text{ UFC g}^{-1}$, a partir de enchidos fermentados, os quais integravam microrganismos como *S. xylosus* e *S. Carnosus* (Simonová *et al.*, 2006). No estudo de Sawitzki e colaboradores (2007) observou-se que a estirpe inoculada de *L. plantarum* não demonstrou capacidade de inibição para SCN (Sawitzki *et al.*, 2007).

Apesar de, na avaliação bacteriocinogénica os isolados utilizados neste estudo demonstrarem potencial de inibição contra a microbiota tecnológica, neste ensaio *in vitro* as amostras contendo apenas *Lactobacillus* apresentaram teores de SCN próximos das

encontradas na amostra controlo ($p>0,05$), indicando que apesar da competição não houve uma inibição de SCN pelos *Lactobacillus* utilizados.

A contagem de BAL (Figura 7.6 b) nas amostras que continham apenas *Lactobacillus* (30, 40 e 340) foi de 5 e 6 \log^{10} UFC g^{-1} e manteve-se nos três primeiros dias semelhante à contagem obtida nas amostras com combinação de *Lactobacillus* e *L. innocua* (320, 420 e 3420). As amostras controlo e 20 (*L. innocua*) apresentaram valores significativamente mais baixos, 1,92 e 1,73 \log^{10} UFC g^{-1} . Ao final das 48 horas não se registraram diferenças significativas quer entre as amostras inoculadas com *Lactobacillus* quer entre as amostras controlo e 20 (*L. innocua*). Quando ocorreu um aumento de temperatura para 20 °C logo após 24 horas (72 horas) não se registraram diferenças significativas nas contagens de BAL.

Ao final das 96 horas, os valores da contagem de BAL nas amostras controlo e 20 (*L. innocua*) foram de 5 \log^{10} UFC g^{-1} . As amostras inoculadas com *Lactobacillus* e *Lactobacillus* e *L. innocua* também não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$), com valores de 8 \log^{10} UFC g^{-1} para as amostras 30 e 420 e valores de 7 \log^{10} UFC g^{-1} para as amostras 40, 340, 320 e 3420. O incremento na multiplicação de BAL observada nas amostras não inoculadas com *Lactobacillus* foi superior ao observado nas inoculadas. De facto a microbiota naturalmente presente na carne pode estar mais adaptada e possuir maior facilidade de crescimento. Contudo, a disponibilidade de nutrientes (açúcares) poderá também limitar o incremento populacional das BAL inoculadas, pois inicialmente a população é maior e compete entre si.

Lactobacillus são um dos microrganismos Gram positivos mais encontrados em carnes frescas (Jay, 2000) e produtos cárneos fermentados (Saad & Franco, 1999). Katikou e colaboradores (2005), reportam, em carnes embaladas a vácuo e refrigeradas teores iniciais (0 horas) de BAL de 4 \log^{10} UFC g^{-1} , após 28 dias os valores atingiram 7 \log^{10} UFC g^{-1} . Já as amostras inoculadas com *L. sakei* e *L. carnosus* (isolados ou em conjugação) obtiveram valores iniciais (0 horas) entre 6 e 7 \log^{10} UFC g^{-1} e após 28 dias de 7 \log^{10} UFC g^{-1} . Neste trabalho os valores foram próximos dos citados pela literatura mas em um menor espaço de tempo, devido a utilização de temperaturas de mimetização das fases de fabrico de enchidos cárneos fermentados (7 °C e 20 °C) (Katikou *et al.*, 2005).

A amostra 20 (inoculada apenas com *L. innocua*) não apresentou diferença significativa nas BAL em relação à amostra controlo (10) às 96 horas de ensaio (5,20 e 5,82 \log^{10} UFC g^{-1} respectivamente), indicando que apesar da presença de *L. innocua* em concentração elevada, as BAL na matéria prima desenvolveram-se. As amostras inoculadas com *Lactobacillus* e com a combinação de *Lactobacillus* + *L. innocua*, não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre si, indicando que a inoculação de *L. innocua* não representou um fator de competição para os isolados de *Lactobacillus*.

As amostras inoculadas com *L. innocua* (20, 320, 420 e 3420) reflectem nas contagem de *Listeria* sp. efectuadas (5,0 a 5,51 \log^{10} UFC g^{-1}) o valor inicial de *L. innocua* inoculada em 25g de amostra.

A contagem de *Listeria* sp. (Figura 7.7) apresentou diferenças significativas ($P<0,05$) entre as amostras não inoculadas (10, 30, 40, 340) e inoculadas com *L. innocua* (20, 320, 420,

3420) no dois primeiros dias do ensaio (0, 24 e 48 horas) a 7 °C. Depois de 48 horas a amostra 320 inoculada com *L. plantarum* e *L. innocua* apresentou uma contagem significativamente mais baixa ($p < 0,05$) do que a amostra 20 (inoculada apenas com *L. innocua*).

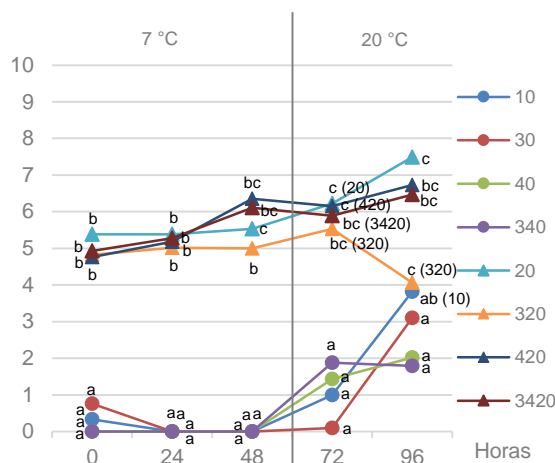


Figura 7.7 – Efeitos das diferentes condições de inoculação numa matriz cárnica sem condimentações armazenada em dois estágios de temperatura ao longo do tempo (horas) para a contagem de *Listeria* sp. (\log^{10} UFC g⁻¹).

Legenda: ab – letras diferentes para o mesmo dia correspondem a médias significativamente diferentes. (●) amostras sem inoculação de *L. innocua*; (▲) amostras com inoculação de *L. innocua*. Códigos e inoculações – 10: Carne sem inoculações; 20: *L. innocua*; 30: *L. plantarum* P3B7; 40: *L. sakei* CV3C2; 320: *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*; 340: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7; 420 – *L. sakei* CV3C2 + *L. innocua*; 3420: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*.

Apenas às 72 horas, após a mudança de fases de mimetização do fabrico (de 7 °C para 20 °C) a amostra controlo (10) e as amostras 40 e 340 (inoculadas com *L. sakei* CV3C2 e *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7, respectivamente), apresentaram contagens de *Listeria* sp. de 1 \log^{10} UFC g⁻¹. Diferentemente, a amostra 30 (*L. plantarum* P3B7) apresentou crescimento (3,10 \log^{10} UFC g⁻¹) apenas às 96 horas de ensaio já à 20 °C, mas sem diferença significativa ($p > 0,05$) das amostras 10, 40 e 340 (com teores entre 1,79 – 3,10 \log^{10} UFC g⁻¹).

No final do período de 7 °C às 48 horas, as amostras inoculadas com *L. innocua* (20, 320, 420 e 3420) apresentaram valores de 5 – 6 \log^{10} UFC g⁻¹. Estas amostras no final das 96 horas, não apresentam valores de *Listeria* sp. significativamente diferentes ($P > 0,05$). Porém, houve efectivamente competição bacteriana, uma vez que as amostras que continham a combinação de *L. innocua* e *Lactobacillus* apresentaram valores de 1 \log^{10} UFC g⁻¹ (420 e 3420) à 2 \log^{10} UFC g⁻¹ (320) inferiores à amostra contendo apenas *L. innocua* (20). A estirpe de *L. plantarum* P3B7 utilizada isoladamente (amostra 320), mostrou-se mais eficiente na inibição do crescimento de *L. innocua* por competição bacteriana, apresentando valores inferiores às outras amostras contendo *Lactobacillus* + *L. innocua*, apesar de não apresentar diferença significativa ($p > 0,05$) com a amostra 20 (inoculada apenas com *L. innocua*).

Deve-se ressaltar que a amostra controlo (10) apresentou um crescimento de *Listeria* sp. de 3,82 \log^{10} UFC g⁻¹ no final das 96 horas, pode-se então presumir que as amostras que continham uma combinação de *Lactobacillus* + *L. innocua* também já possuíam uma contaminação inicial de *Listeria* sp. provinda da matéria prima, sendo assim as condições de competição foram muito maiores do que a prevista pelo ensaio. Apesar da presença de *Listeria* spp. nas amostras 30 e 10 (0,76 e 0,33 \log^{10} UFC g⁻¹ respectivamente) às 0 horas, os valores

não possuem diferenças significativas ($p>0,05$) em relação às amostras 40 e 340 contendo apenas *Lactobacillus* ($0,00 \log^{10}$ UFC g^{-1} para ambas).

Sabe-se que *Listeria* pode ser encontrada nos mais variados ambientes. A sua presença em carcaças de animais e em carnes cruas é vastamente descrita em literatura (Lake *et al.*, 2002; Moreno, 2013; Pocięcha, 1990; Thévenot *et al.*, 2006). No estudo de Navratilova e colaboradores (2004) isolaram-se estirpes de *L. monocytogenes* em carne crua destinada a produção de enchidos cárneos (Navratilova *et al.*, 2004). Jones e colaboradores (2009) descrevem que duas estirpes de *L. sakei*, uma produtora e outra não produtora de bacteriocinas, inibiram *L. monocytogenes* em carnes mas os níveis óptimos de inibição são co-dependentes da concentração inicial dos microrganismos testados e competidores (Jones *et al.*, 2009). Enan e colaboradores (2002) descrevem em carne que a inibição de *L. monocytogenes* por uma estirpe de *L. plantarum* ocorreu não pela ação do ácido produzido, mas sim pela actuação da bacteriocina (plantaricin) pela estirpe de *Lactobacillus* (Enan *et al.*, 2002).

O pH das diferentes amostras inoculadas ou não inoculadas com *Lactobacillus* nos períodos 0, 48 e 96 horas (Tabela 7.3) não foi diferente ($p>0,05$). Das amostras inoculadas com *Lactobacillus*, apenas a amostra 340 apresentou uma ligeira redução do pH ao final às 96 horas de ensaio.

Tabela 7.3 – Valores do pH para as amostras de massa de carne não condimentada.

Tempo (h)	Controlo (10)			<i>L. plantarum</i> P3B7 (30)		<i>L. sakei</i> CV3C2 (40)		<i>L. plantarum</i> P3B7 + <i>L. sakei</i> CV3C2 (340)	
	Média	dv		Média	dv	Média	dv	Média	dv
0	6,19 ^a	0,010		6,20 ^a	0,085	6,16 ^a	0,052	6,23 ^a	0,041
pH 48	6,17 ^a	0,015		6,16 ^a	0,030	6,17 ^a	0,020	6,26 ^a	0,025
96	6,17 ^a	0,032		6,16 ^a	0,040	6,16 ^a	0,030	6,16 ^a	0,153
Sig	0,390	*		0,502	*	0,096	*	0,919	*

Legenda: dv – Desvio Padrão. ab – letras diferentes para o mesmo dia correspondem a médias significativamente diferentes.

7.2.3 Evolução da microbiota na massa de chouriço inoculada com *Lactobacillus*

A evolução dos parâmetros microbiológicos estudados na matriz massa de chouriço inoculada com isolados de *Lactobacillus* e *L. innocua*, mantida a 7 °C durante dois dias e posteriormente a 20 °C durante outros dois dias estão representados nas Figuras Figura 7.8, Figura 7.9, Figura 7.10 e no Apêndice D.

As amostras inoculadas apresentaram teores de AT a 30 °C (Figura 7.8 a) significativamente ($p<0,05$) mais elevados do que a amostra controlo. Ao final das 48 horas, as contagens das amostras inoculadas com *Lactobacillus* (5 a $6 \log^{10}$ UFC g^{-1}), conjugação de *Lactobacillus* + *L. innocua* ($6 \log^{10}$ UFC g^{-1}) e *L. innocua* (amostra 2; $5,86 \log^{10}$ UFC g^{-1}) mantiveram-se significativamente diferentes ($p<0,05$) das obtidas na amostra controlo ($3,15 \log^{10}$ UFC g^{-1}).

Após 96 horas de ensaio, as amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus*, amostras 3 e 34, apresentaram teores de $6 \log^{10}$ UFC g^{-1} enquanto as amostras 4 e controlo

apresentaram teores de $7 \log^{10}$ UFC g⁻¹. Já as amostras inoculadas com *L. innocua* (2, 32, 42 e 342) apresentaram valores de $7 \log^{10}$ UFC g⁻¹. Não se registraram diferenças significativas ($p>0,05$) entre as amostras no final do ensaio.

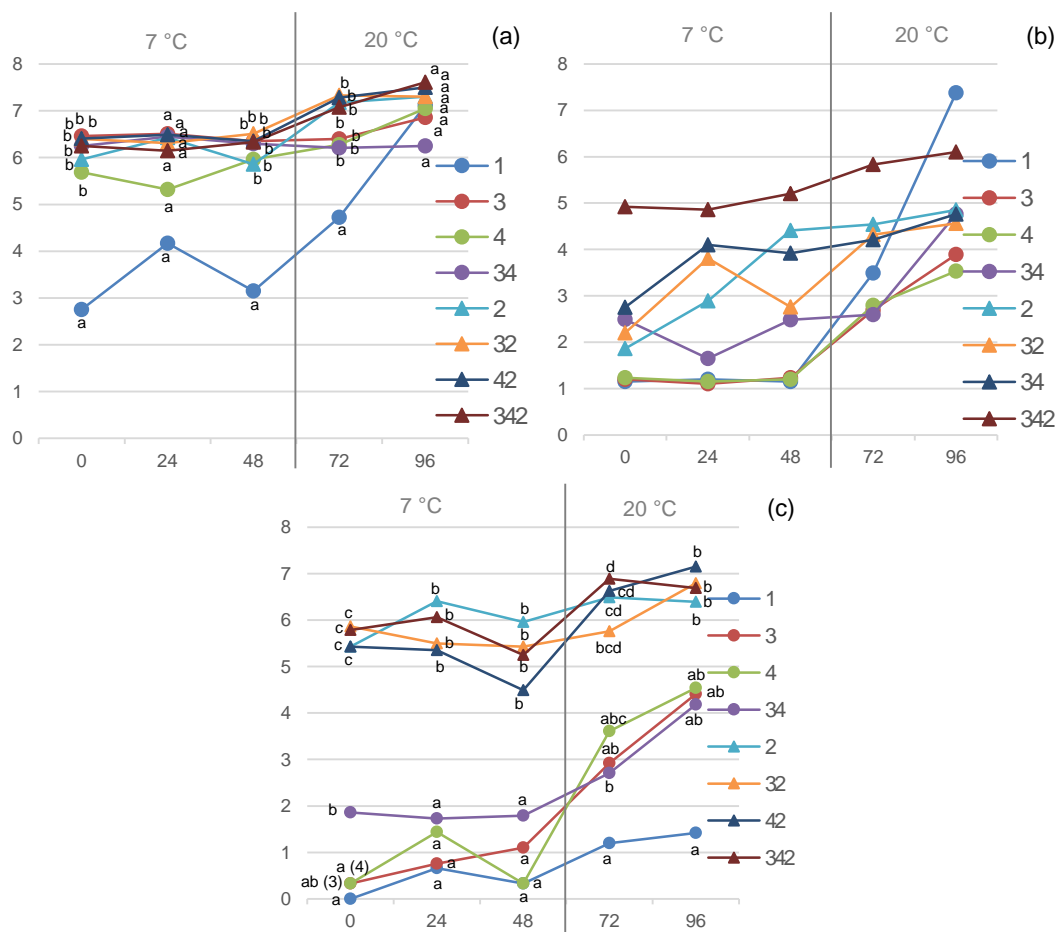


Figura 7.8 – Efeitos das diferentes condições de inoculação numa matriz de massa de chouriço armazenada em dois estágios de temperatura ao longo do tempo (horas) nos parâmetros microbiológicos analisados (\log^{10} UFC g⁻¹).

Legenda: (a) – Contagem de microrganismos AT a 30 °C; (b) – Contagem de *Pseudomonas*; (c) – Contagem de *Enterobacteriaceae*; ab – letras diferentes para o mesmo dia correspondem a médias significativamente diferentes. (●) amostras sem inoculação de *L. innocua*; (▲) amostras com inoculação de *L. innocua*. Códigos e inoculações – 1: Carne sem inoculações; 2: *L. innocua*; 3: *L. plantarum* P3B7; 4: *L. sakei* CV3C2; 32: *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*; 34: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7; 42: *L. sakei* CV3C2 + *L. innocua*; 342: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*.

Matos e colaboradores (2013) relataram que diferentes amostras de enchidos fermentados apresentaram contagens de AT entre 4 e $7 \log^{10}$ UFC g⁻¹ (Matos *et al.*, 2013).

A diferença de condições de 7 °C para 20 °C levou a um maior incremento na multiplicação de microrganismos AT 30 °C na amostra controlo comparado com o registrado nas amostras inoculadas com *Lactobacillus*. Uma vez que o meio de cultura para AT a 30 °C permite também o crescimento de BAL estes resultados sugerem que ocorre um controlo na microbiota da amostra pelos isolados de *Lactobacillus* que foram inoculados.

As amostras em estudo inoculadas *L. innocua* apresentaram inicialmente contagens de *Pseudomonas* (Figura 7.8 b) entre $1 \log^{10}$ UFC g⁻¹ (controlo), e $2 \log^{10}$ UFC g⁻¹, apenas a amostra 342 apresentou valores superiores ($4,92 \log^{10}$ UFC g⁻¹). Ao fim das 48 horas não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre as amostras.

A amostra controlo (1) às 96 horas apresentou uma contagem de $7,38 \log^{10}$ UFC g⁻¹ para o parâmetro *Pseudomonas*, enquanto as amostras contendo apenas *Lactobacillus* apresentaram valores de 3 a $4 \log^{10}$ UFC g⁻¹, e as amostras contendo *L. innocua* apresentaram valores entre 4 e $6 \log^{10}$ UFC g⁻¹. Apesar de não existirem diferenças significativas ($p>0,05$) nos resultados finais pode-se observar uma tendência na redução da multiplicação de *Pseudomonas* nas amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus*.

Katikou e colaboradores (2005) observaram que a utilização de *L. sakei* sem conjugação com outros microrganismos possui um efeito maior na inibição de *Pseudomonas* (Katikou *et al.*, 2005). No presente estudo verificou-se também que a utilização das estirpes isoladamente possui um maior efeito no controlo da multiplicação de *Pseudomonas*. Os valores de contagem de *Pseudomonas* às 96 horas e em temperatura de 20 °C, para as amostras onde *L. plantarum* ou *L. sakei* foram inoculados separadamente (3 e 4) são inferiores à amostra onde houve inoculação conjugada dos dois isolados (34). A mesma tendência é observada nas amostras contendo *L. innocua*, sendo as amostras 32 (P3B7) e 42 (CV3C2) com *Lactobacillus* inoculados isoladamente em comparação com a amostra 342 inoculada com a conjugação dos dois *Lactobacillus*. Djenane e colaboradores (2005) descreve que a utilização de *L. sakei* como ferramenta protectora em carnes é eficaz na inibição não só de *Pseudomonas* mas também de *B. thermosphacta* (Djenane *et al.*, 2005).

A contagem de *Enterobacteriaceae* (Figura 7.8 c) nas amostras inoculadas com *L. innocua* (2, 32, 42 e 342), às 0 e 24 horas de ensaio (7 °C) foram significativamente diferentes ($p<0,05$) das amostras controlo e inoculadas com P3B7, *L. sakei* CV3C2 e a conjugação das duas.

Às 48 horas de ensaio o controlo ($0,33 \log^{10}$ UFC g⁻¹) e as amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus* 4, 3 e 34 ($0,33$, $1,10$ e $1,79 \log^{10}$ UFC g⁻¹ respectivamente) não apresentaram diferença significativa entre si ($p>0,05$). Também as amostras em que *Listeria* tenha sido inoculada não tiveram diferença significativa entre si ($p>0,05$), apresentando valores de 4 a $5 \log^{10}$ UFC g⁻¹.

Ao fim das 96 horas de ensaio não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre as amostras inoculadas com *Lactobacillus* ou *L. innocua*. As amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus* (3, 4 e 34) apresentaram valores de $4 \log^{10}$ UFC g⁻¹. Apenas a amostra controlo ($1,42 \log^{10}$ UFC g⁻¹) apresentou um teor significativamente diferente ($p<0,05$) em comparação às amostras inoculadas com *L. innocua* (2, 32, 42 e 342) (valores de 6 a $7 \log^{10}$ UFC g⁻¹).

O controlo de *Enterobacteriaceae* por *Lactobacillus* foi descrito em estudos realizados por Katikou e colaboradores (2005) com carnes embaladas a vácuo e refrigeradas (4 °C) (Katikou *et al.*, 2005). Estes autores verificaram que a actuação de uma estirpe de *L. sakei* mostrouse mais eficiente do a sua conjugação com outra estirpe de *Lactobacillus*, com redução da contagem de *Enterobacteriaceae* em $2 \log^{10}$ UFC g⁻¹ em comparação ao seu controlo (Katikou *et al.*, 2005). Newton & Gil (1978) relatam em seus estudos que a eficiência de *Lactobacillus* sp., em concentrações de $7 \log^{10}$ UFC g⁻¹, na inibição de microrganismos como

Enterobacteriaceae e *B. thermosphacta* se dá maioritariamente pela atividade de produção de ácido láctico e peróxido de hidrogénio e não pela produção de bacteriocinas (Newton & Gil, 1978). No presente estudo a estirpe *L. sakei* CV3C2 não apresentou valores inferiores para *Enterobacteriaceae* em relação a estirpe *L. plantarum* P3B7, apesar de produzir maiores quantidades de ácido láctico.

Os elevados valores observados para as amostras inoculadas com *L. innocua*, nas diferentes fases de mimetização de fabrico de enchidos (à 7 °C e 20 °C), foram continuamente superiores em relação às amostras sem inoculação de *L. innocua* (controlo, 3, 4 e 34). Apesar de não haver diferenças significativas entre a contagem de *Enterobacteriaceae* nas amostras inoculadas com *Lactobacillus* e/ou inoculadas com *L. innocua*, presume-se que, como outros parâmetros avaliados, o meio específico não foi suficiente para inibir a multiplicação de *L. innocua*.

As contagens iniciais (0 horas) de SCN (Figura 7.9 a) para as amostras que tenham sido inoculadas com *L. innocua* (2, 32, 42 e 342) apresentaram diferenças de 1 a 2 log¹⁰ UFC g⁻¹ em relação às outras amostras (1, 3, 4 e 34). Ao longo do ensaio a 7 °C, as amostras com *L. innocua* continuaram com teores superiores a 1 a 2 log¹⁰ UFC g⁻¹ quando se compara com as amostras controlo e inoculadas apenas com *Lactobacillus*. Ao fim de 96 horas e com o aumento da temperatura a 20 °C, todas as amostras apresentaram valores de 6 log¹⁰ UFC g⁻¹ para SCN (p>0,05).

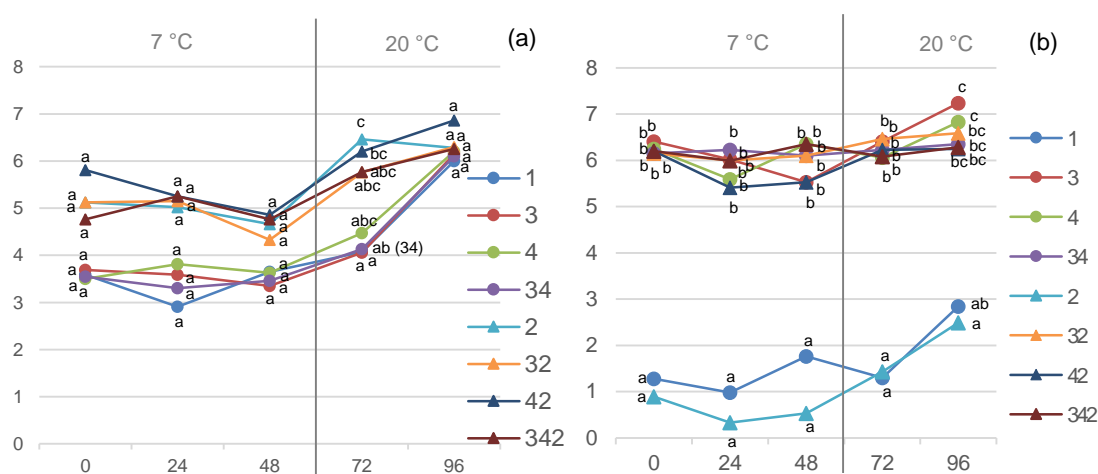


Figura 7.9 – Efeitos das diferentes condições de inoculação numa matriz de massa de chouriço armazenada em dois estágios de temperatura ao longo do tempo (horas) nos parâmetros microbiológicos analisados (log¹⁰ UFC g⁻¹).

Uma vez que a contagem de SCN na amostra controlo (1) não diferiu das apresentadas pelas outras amostras no final das 96 horas, presume-se que não houve interferência no desenvolvimento destes microrganismos por competição bacteriana nas amostras inoculadas com *Lactobacillus* ou conjugação de *Lactobacillus* + *L. innocua*. Mauriello e colaboradores

(2004) e Talon e colaboradores (2007) descreveram em seu estudo que, em diferentes tipos de enchidos fermentados, o crescimento de SCN manteve-se sempre abaixo do crescimento de BAL, mas que apesar dos valores inferiores não há inibição de SCN por BAL (Mauriello *et al.*, 2004; Talon *et al.*, 2007).

As amostras controlo e 2 (inoculada com *L. innocua*) não apresentaram diferenças significativa ($p > 0,05$), nas contagens de BAL (Figura 7.9 b). Todas as amostras inoculadas com *Lactobacillus* tiveram contagens de BAL de $6 \log^{10}$ UFC g⁻¹, com exceção da amostra 30 que apresentou $7 \log^{10}$ UFC g⁻¹. A evolução deste grupo bacteriano no fim das duas fases de temperatura nas amostras 1 e 2 foi semelhante, com valores de 2,84 e 2,49 \log^{10} UFC g⁻¹ respectivamente.

No final das 96 horas de ensaio apenas as amostras 3 e 4 apresentaram contagens de BAL significativamente diferentes das presentes no controlo e na amostra 2 (inoculada com *L. innocua*). As teores de BAL nas amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus* (3, 4 e 34) foram semelhantes aos obtidos nas amostras inoculadas com a conjugação de *Lactobacillus* + *L. innocua* (32, 42 e 342), demonstrando que este grupo de microrganismos não teve a sua multiplicação afetada pela presença de *Listeria*.

A microbiota tecnológica em produtos cárneos fermentados é constituída principalmente por BAL atingindo valores entre 4 e 8 \log^{10} UFC g⁻¹, durante as fases de maturação e fermentação do produto (Lebert *et al.*, 2007a). A sua participação na produção de enchidos cárneos é essencial, uma vez que são as principais responsáveis pelo desenvolvimento das características do produto e pela inibição de microrganismos indesejáveis. Mauriello e colaboradores. (2004) relataram que o desenvolvimento de BAL em enchidos fermentados é maior (2 a 3 \log^{10} UFC g⁻¹ superiores) em relação a outros microrganismos tecnológicos, como *S. xylosum* e *S. carnosus*, em especial nas massas formuladas onde alguma fonte de açúcares tenha sido adicionada (Mauriello *et al.*, 2004). Sawitzki e colaboradores (2008) descrevem que a utilização de uma estirpe de *L. plantarum* na produção enchidos fermentados teve uma actuação positiva no controlo da microbiota deteriorativa do produto (Sawitzki *et al.*, 2008).

As contagens iniciais de *Listeria* sp. (Figura 7.10) na massa de chouriço (controlo) e nas amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus* foram de 1 a 3 \log^{10} UFC g⁻¹. Já as amostras inoculadas com *L. innocua* apresentaram contagens de 5 \log^{10} UFC g⁻¹. Às 24 horas apenas o controlo e a amostra 20 apresentaram diferença significativas ($p < 0,05$) na contagem de *Listeria*, com valores de 2,20 e 5,69 \log^{10} UFC g⁻¹ respectivamente. No final do período de temperatura a 7 °C as contagens de BAL foram iguais nas amostras.

A amostra controlo (1) apresentou contagens de *Listeria* sp. semelhantes às existentes nas amostras 3, 4 e 34.

Entre as amostras inoculadas com *Listeria*, a amostra 32 foi a que apresentou o menor valor final (5,73 \log^{10} UFC g⁻¹), apresentando 1 \log^{10} UFC g⁻¹ a menos do teor presente na amostra 2 (6,65 \log^{10} UFC g⁻¹).

A presença e contagem de *Listeria* sp. nas amostras onde *L. innocua* não foi inoculada pode indicar não só uma contaminação inicial da matéria prima mas também uma contaminação cruzada através de utensílios e equipamentos utilizados na produção da massa formulada. A capacidade de produção de biofilme e a sua resistência a técnicas de limpeza e desinfecção de espécies de *Listeria* sp., em especial *L. monocytogenes*, é vastamente descrita em literatura (Azevedo *et al.*, 2005; Bonsaglia, 2014; Goh *et al.*, 2014; Norwood & Gilmour, 2000).

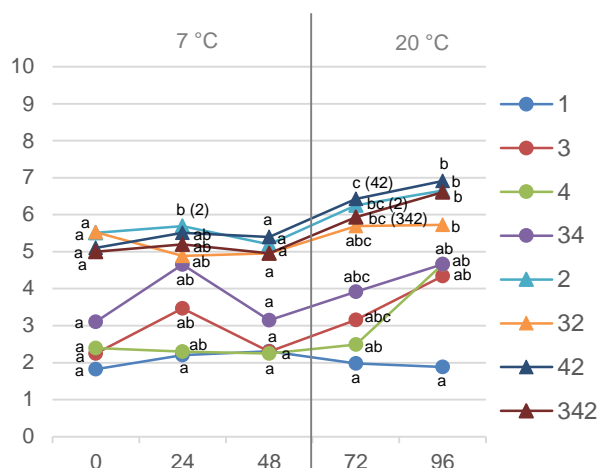


Figura 7.10 – Efeitos das diferentes condições de inoculação numa matriz de massa de chouriço armazenada em dois estágios de temperatura ao longo do tempo (horas) na contagem de *Listeria* sp. (\log^{10} UFC g^{-1}).

Legenda: ab – letras diferentes para o mesmo dia correspondem a médias significativamente diferentes. (●) amostras sem inoculação de *L. innocua*; (▲) amostras com inoculação de *L. innocua*. Códigos e inoculações – 1: Carne sem inoculações; 2: *L. innocua*; 3: *L. plantarum* P3B7; 4: *L. sakei* CV3C2; 32: *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*; 34: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7; 42: *L. sakei* CV3C2 + *L. innocua*; 342: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*.

Os resultados da medição do pH nas amostras do ensaio *in vitro* utilizando massa formulada de chouriço podem ser observados na Tabela 7.4. A amostra controlo foi a única que apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) de pH entre os tempos de análise. Todas as amostras apresentaram valores próximos no final das 96 horas (pH 6,08 – 6,11). A amostra controlo (1) e a amostra 4 apresentaram um decréscimo de pH ao longo dos cinco dias de ensaio. Esse decréscimo de pH não ocorreu nas amostras 34 e 3.

Tabela 7.4 – Valores do pH para as amostras de massa formulada de chouriço.

	Tempo (h)	Controlo (1)		<i>L. plantarum</i> P3B7 (3)		<i>L. sakei</i> CV3C2 (4)		<i>L. plantarum</i> P3B7 + <i>L. sakei</i> CV3C2 (34)	
		Média	dv	Média	dv	Média	dv	Média	dv
pH	0	6,11 ^a	0,005	6,08 ^a	0,047	6,10 ^a	0,020	6,01 ^a	0,017
	48	6,07 ^{ab}	0,011	6,06 ^a	0,047	6,07 ^a	0,023	6,04 ^a	0,075
	96	6,08 ^b	0,025	6,08 ^a	0,020	6,08 ^a	0,020	6,11 ^a	0,070
	Sig	0,031	*	0,212	*	1,300	*	2,154	*

Legenda: dv – Desvio Padrão. ab – letras diferentes para o mesmo dia correspondem a médias significativamente diferentes.

7.2.4 Discussão integrada dos resultados

Ao longo do período de exposição a 7 °C e 20 °C as amostras inoculadas com *Lactobacillus* e com a conjugação de *Lactobacillus* e *L. innocua*, evidenciaram um menor diferencial na multiplicação de AT a 30 °C.

Em ambas as matrizes (carne sem condimentos e massa de chouriço) expostas a uma temperatura de 7 °C, os controlos (1 e 10) apresentaram um aumento de AT de 1 log¹⁰ (Apêndice E) durante as primeiras 48 horas de ensaio. Uma vez que as amostras foram transferidas para uma temperatura mais elevada (20 °C) os valores de AT subiram 4 e 5 log¹⁰, respectivamente, até o final das 96 horas de ensaio.

De facto, atendendo aos valores iniciais de AT nas amostras controlo (1 e 10), o acréscimo deste grupo foi maior comparativamente ao apresentado pelas amostras inoculadas com *Lactobacillus*.

As amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus* não apresentaram acréscimo na taxa de crescimento de AT enquanto as amostras eram expostas a 7 °C. Já às 96 horas, quando a temperatura aumentou para 20 °C, as amostras em matriz carne sem condimentação, 30 e 340, apresentaram um acréscimo de AT de 2 log¹⁰ e a amostra 40 de 1 log¹⁰, já a amostra 4 em matriz de massa formulada apresentou um acréscimo de 2 log¹⁰ e as amostras 3 e 34 não apresentaram mudança nos teores bacterianos.

Dentre as conjugações de *Lactobacillus* estudadas, a utilização de *L. plantarum* P3B7 e a conjugação entre P3B7 + CV3C2 em matriz de massa formulada de chouriço (amostras 3 e 34) foram as mais efectivas no controlo da multiplicação de AT. Contudo, na matriz carne sem condimentação a utilização de *L. sakei* CV3C2 (amostra 40) foi a mais efectiva no controlo da multiplicação de AT.

No presente estudo, ambos os ensaios efectuados com carne sem condimentos e massa de chouriço, os teores de AT a 30 °C nas amostras, ao fim das 96 horas, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si. Entretanto, comparando os valores iniciais e finais entre amostras inoculadas e respectivos controlos, as amostras inoculadas apresentaram um menor diferencial na multiplicação bacteriana de AT ao longo do tempo, não igualando o crescimento de carácter exponencial das amostras controlo. Pode-se acreditar que a inibição de AT nas amostras inoculadas se dê pela presença dos isolados de *Lactobacillus*.

O meio de cultura utilizado nas contagens de AT a 30 °C permite o crescimento de microrganismos como *Lactobacillus* e *Listeria*, pois não é selectivo. É necessário ter em consideração que os valores iniciais para a contagem de AT nas amostras inoculadas, reflectem a presença dos microrganismos inoculados na matriz e não somente a presença de microbiota deteriorativa.

Sawitzki e colaboradores (2008) relataram que, em enchidos fermentados inoculados com estirpe de *L. plantarum*, houve uma redução inferior a 1 log¹⁰ nos teores de AT em relação ao controlo, ao fim de 10 dias (Sawitzki *et al.*, 2008). No presente estudo as amostras inoculadas com *Lactobacillus* demonstraram valores de até 4 log¹⁰ inferiores em relação aos controlos, para ambos os ensaios.

Fiorentini e colaboradores (2001), descrevem a inibição do crescimento de AT em diferenças de 1 a 2 log¹⁰ em carnes refrigeradas (5 °C) nas quais foram utilizadas soluções contendo bacteriocinas, produzidas por *Lactobacillus* isolados de carne (Fiorentini *et al.*, 2001). Carbonera & Espírito Santo (2010) relataram que a inibição da microbiota deteriorativa (AT), em produtos cárneos fermentados a base de peixe, por estirpe de *L. plantarum* foi realmente efectiva após o início da fase de fermentação num período de sete dias após a inoculação, onde os valores para o controlo tiveram uma variação de 2 log¹⁰ a mais em relação às amostras inoculadas com *L. plantarum* (Carbonera & Espírito Santo, 2010).

As elevadas contagens iniciais de *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* e SCN nas amostras inoculadas com *L. innocua* podem indiciar uma falsa conclusão. Os meios de selectividade para estes microrganismos não atuam de forma eficaz para o controlo do crescimento de *Listeria* sp.. Tornando inviável avaliar o potencial de competição microbiana dos isolados de *Lactobacillus* nas amostras conjugadas (em que *L. innocua* foi inoculada), para os parâmetros de *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* e SCN.

O meio para SCN utilizado possui uma alta concentração salina (75 g NaCl/L) como factor limitante de crescimento, permitindo que apenas microrganismos halofílicos consigam desenvolver-se. É descrito em literatura que *Listeria* spp., entre as quais *L. monocytogenes*, consegue facilmente suportar altas quantidades de sal (Zarei *et al.*, 2012). *L. monocytogenes* pode suportar uma concentração de até 10 % (w/v) de NaCl em pH entre 3,8 e 8,4. (McClure *et al.*, 1989; Zarei *et al.*, 2012) O stress salino em *L. monocytogenes* pode ser superado pela ativação de genes que sintetizam diferentes proteínas, consideradas osmoprotetoras (Gandhi & Chikindas, 2007). Estas substâncias permitem que ocorra uma acumulação de solutos compatíveis no citosol, que possibilitam contrabalancear a osmolaridade externa, prevenindo a perda de água e a plasmólise celular. São elas a prolina, a glicina-betaína e a carnitina (Beumer *et al.*, 1994; Considine *et al.*, 2011; Duché *et al.*, 2002; Gardan *et al.*, 2003)

As colónias observadas em meio MSA possuíam um halo amarelado, caracterizado pela fermentação do manitol. Ruesca (2012) evidenciou a capacidade de algumas estirpes de *Listeria* sp. fermentarem o manitol. Esta fermentação produz metabólitos bacteriano ácidos, que fazem com que o corante fenólico do meio mude de coloração e os halos das colónias bacterianas fiquem amarelado.

A adição de glucose no meio específico para *Enterobacteriaceae* é um factor diferenciador para a selectividade do meio, onde apenas microrganismos que consigam fazer proveito desta substância podem desenvolver-se. A presença de corantes como o cristal violeta, também fornece uma maior selectividade ao meio. Sabe-se que diferentes estirpes de *Listeria* sp. tem a capacidade de lisar a glicose. Ludwig e colaboradores (2009b) relatam que espécies de *Listeria*, como *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. grayi* têm a capacidade de degradar D-glucose (Ludwig *et al.*, 2009b), tornando possível o seu crescimento no meio VRDB agar.

A capacidade de inibição de *Pseudomonas* pelas isolados de *Lactobacillus* é mais efectivo na matriz de chouriço, onde os valores aumentaram de 1 a 2 log¹⁰ , durante as 96

horas de ensaio, para todas as amostras inoculadas (3, 4, 34, 32, 42 e 342), enquanto em matriz carne sem condimentações o acréscimo foi de 2 a 6 log¹⁰ para as amostras com as mesmas inoculações (30, 40, 340, 320, 420 e 3420).

Katikou e colaboradores (2005) também relataram uma razão de 1 log¹⁰ inferior na contagem de *Pseudomonas* após um período de 7 dias, em relação a amostras de carne refrigeradas (4 °C) inoculadas com *L. sakei* (Katikou *et al.*, 2005). Djenane e colaboradores (2005) relatam os mesmos valores de diferença mesma diferença em carnes em atmosfera modificada (CO₂) onde *L. sakei* também foi inoculado (Djenane *et al.*, 2005).

Infelizmente, este parâmetro não permitiu analisar de forma efectiva o poder de inibição de *Pseudomonas* pelos isolados de *Lactobacillus*, uma vez que as variações no diferencial de multiplicação de *Pseudomonas* entre as amostras foram semelhantes, em ambos os ensaios.

Assim como os valores de *Pseudomonas*, os valores para as contagens de *Enterobacteriaceae* tiveram um diferencial superior no ensaio utilizando matriz carne sem condimentações.

Dentre as amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus*, a amostra 34 (conjugação de *L. plantarum* P3B7 e *L. sakei* CV3C2) apresentou um menor diferencial na multiplicação de *Enterobacteriaceae* (2,32 log¹⁰) no final do ensaio. Na matriz carne sem condimentação a amostra contendo apenas *L. plantarum* P3B7 apresentou valor semelhante (2,93 log¹⁰), sendo a menor diferença encontrada entre as amostras neste ensaio mas ainda sim apresentava-se semelhante ao controlo. Katikou e colaboradores (2005) apresentaram resultados onde a conjugação de duas estirpes de *Lactobacillus* (*sakei* e *curvatus*) foi menos eficaz na inibição de *Enterobacteriaceae* em carnes refrigeradas (5 °C), em comparação com utilização de *L. sakei* individualmente, durante 28 dias de ensaio (Katikou *et al.*, 2005).

Enterobacteriaceae estão relacionadas com padrões higiénicos no processo de fabrico (Durlu-Ozkaya *et al.*, 2000).

Apesar das diferenças significativas nos valores de *Enterobacteriaceae* no decorrer dos ensaios, não se pode observar um controlo da sua multiplicação pelos isolados de *Lactobacillus*, uma vez que os diferenciais ao final dos ensaios (96 horas) eram superiores ou não apresentavam diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os controlos.

Diferentemente dos parâmetros de *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae*, as contagens de SCN apresentaram diferenciais semelhantes (Apêndice E), entre as 0 e as 96 horas, para ambos os ensaios. As amostras inoculadas apenas com *Lactobacillus* apresentavam valores de 2 log¹⁰ em ambas as matrizes. Entretanto, eram semelhantes aos valores apresentados pelas respectivas amostras controlo.

O fator de temperatura foi essencial para a multiplicação de microrganismos SCN em ambas as matrizes avaliadas. As amostras inoculadas com os isolados de *Lactobacillus* apresentaram um aumento no teor de SCN apenas durante a fase de mimetização de temperaturas de fumagem de enchidos cárneos (20 °C), os valores iniciais mantiveram-se iguais das 0 às 48 horas (7 °C).

Na avaliação do potencial bacteriocinogénico dos isolados de *Lactobacillus*, ambas as estirpes utilizadas no ensaio *in vitro* apresentaram capacidade de inibição para com a microbiota tecnológica, representada por *S. equorum* e *S. xylosus*, onde o isolado *L. plantarum* P3B7 apresentou os maiores halos de inibição e o isolado *L. sakei* CV3C2 os menores halos. Apesar destes resultados, e dos valores superiores nas contagens de BAL em relação aos SCN em ambas as matrizes do ensaio *in vitro*, não houve inibição na multiplicação da microbiota tecnológica, constituída por SCN, pelos isolados de *Lactobacillus* (P3B7 e CV3C2) em ambas as matrizes.

Microrganismos como SCN são essenciais para o desenvolvimento de características específicas em enchidos cárneos, auxiliando na fermentação e na cor final do produto (Lebert *et al.*, 2007a; Mauriello *et al.*, 2003) e normalmente estão presentes em valores inferiores às BAL (Lebert *et al.*, 2007a). Uma relação harmónica entre diferentes bactérias de carácter tecnológico é essencial para o desenvolvimento de características típicas de produtos cárneos fermentados (Beck, 2005; Lebert *et al.*, 2007a). A maior diversidade na microbiota tecnológica pode aprimorar o potencial de biopreservação no produto, Aksu e colaboradores (2008) relatam o poder de inibição de microrganismos patogénicos por estirpes tecnológicas de *L. sakei* e *S. xylosus* (Aksu *et al.*, 2008).

No sentido de validar a presença de BAL indígena nas diferentes matrizes, podemos observar a presença e evolução de BAL nos diferentes controlos, analisando a sua capacidade de multiplicação e adaptação às diferentes matrizes. O diferencial (\log^{10}) entre o início e o fim do ensaio foi de 1,56 para o controlo 1 (massa de chouriço) e 4,13 para o controlo 10 (massa carne sem condimentações).

Na matriz de chouriço, o controlo (1) não apresentou um crescimento significativo ($p > 0,05$) entre os períodos das 48 horas a 7 °C e das 72 horas a 20 °C. Já na massa carne sem condimentações, o valor diferencial para o controlo (10) das 0 às 48 horas (7 °C) foi de 0,78 \log^{10} , e uma vez que houve o aumento da temperatura para 20 °C o valor diferencial das 48 às 72 horas foi superior, de 2,22 \log^{10} .

Assim como nas amostras controlo, as contagens de BAL para as amostras inoculadas apenas com *L. innocua* também apresentaram um acréscimo mais elevado quando submetidas a uma temperatura de 20 °C. Na massa carne sem condimentações (amostra 20) o valor diferencial foi superior, de 2,51 \log^{10} , em comparação à mesma inoculação na matriz de chouriço (amostra 2, com diferencial de 0,90 \log^{10}).

As BAL indígenas da matéria prima apresentaram uma melhor multiplicação e adaptação à matriz carne sem condimentações, uma vez que não há atividade antimicrobiana pela actuação de ingredientes e condimentações como na matriz de massa formulada de chouriço. Também conseguem desenvolver-se mesmo na presença de outros microrganismos, como nas amostras inoculadas apenas com *L. innocua* (2 e 20) não tendo a sua multiplicação sido afectada pela competição bacteriana.

De forma a analisar a efectividade de multiplicação e adaptação dos isolados de *Lactobacillus* avaliados neste estudo, podemos comparar nos ensaios *in vitro* o diferencial

entre as amostras inoculadas com as estirpes de *Lactobacillus*, de forma isolada ou conjugada, nas diferentes matrizes.

Às 96 horas e temperaturas de 20 °C, mimetizando temperaturas na fase de fumagem de produtos cárneos, as amostras de massa de chouriço 4 (CV3C2) e 3 (P3B7) apresentaram as maiores diferenças de crescimento, de 0,58 e 0,83 log¹⁰ respectivamente. Na mesma matriz, mas em presença de *L. innocua*, a amostra 32 (P3B7 + *L. innocua*) apresentou a menor variação de crescimento (0,44 log¹⁰). Já em matriz de carne sem condimentações, ambas as conjugações de *L. innocua* + P3B7 (320) ou *L. innocua* + CV3C2 (420) apresentaram um diferencial de 2 log¹⁰.

A conjugação dos isolados de *Lactobacillus* na presença de *L. innocua* (amostras 342 e 3420) mostraram-se menos eficaz na multiplicação de BAL na matriz carne sem condimentação, com um diferencial entre às 0 e 96 horas de 0,08 log¹⁰.

O isolado de *L. plantarum* P3B7 apresentou uma melhor adaptação na matriz de massa formulada de chouriço, com ou sem a presença de *L. innocua* (amostras 3 e 32). Na matriz carne sem condimentações, não houve diferença no crescimento entre as amostras sem *Listeria* (30, 40 e 340), mas a variação de crescimento foi maior para as amostras com a presença de *Listeria* e sem conjugação de *Lactobacillus* (320 e 420).

Ambos os isolados apresentaram variação de crescimento semelhante na matriz carne sem condimentação na presença de *L. innocua*, com valores entre 1 e 2 log¹⁰ para a amostra conjugada 3420 e para as amostras 320 e 420.

BAL são microrganismos psicrotróficos, mas apesar de crescerem em temperaturas de 2 – 53 °C a sua multiplicação a 7 °C ainda é lenta, tendo como temperatura óptimas de crescimento de 20 – 30 °C (Hammes & Hertel, 1901). Em ambas as matrizes nas amostras inoculadas com *Lactobacillus*, os diferenciais das contagens de BAL mantiveram-se com valores semelhantes (≤ 1 log¹⁰) durante os intervalos entre 0 e 48 horas à temperatura de 7 °C e entre 48 e 72 horas à temperatura de 20 °C.

Durante a confecção de enchidos fermentados, nos primeiros dias (de 1 a 3 dias) as BAL têm um crescimento mais lento atingindo de 3 à 5 log¹⁰ UFC g⁻¹, e nos dias consequentes dependendo do tipo de produto cárneo os valores sobem para 6 à 9 log¹⁰ UFC g⁻¹ (Garriga & Aymerich, 2007). A inoculação de culturas protectoras em enchidos cárneos pode variar de 5 à 7 log¹⁰ UFC g⁻¹ (Andersen, 1995). Dos isolados de *Lactobacillus* utilizados foi lento durante os quatro dias de ensaio apresentando valores de crescimento idênticos aos descritos na literatura para culturas *starters* e utilizadas em ensaios de antagonismo (Fiorentini *et al.*, 2001; Garriga & Aymerich, 2007; Katikou *et al.*, 2005).

A maior facilidade de desenvolvimento e adaptação dos inóculos de *Lactobacillus* em matriz de carne sem condimentações decorre efectivamente da ausência de condimentos como o sal, o pimentão e em especial o alho. A alicina é o principal componente presente no alho sendo responsável por um efeito antimicrobiano, actuando tanto em bactérias Gram positivas como em Gram negativas, e está presente no alho fresco em valores entre 0,3 e 0,5 % (Shelef, 1983). O extrato de alho também possui um potencial inibidor de bactérias como *S.*

aureus, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* e *L. plantarum* (Shelef, 1983; Zhang *et al.*, 2010). Outros componentes, como o oregão, também podem interferir no desenvolvimento de culturas *starters* compostas por *Lactobacillus* (Zaika & Kissinger, 1981). A redução nas quantidades de certos condimentos, assim como a adição de maior quantidade de substrato (como a dextrose), podem otimizar o crescimento e adaptação de BAL em massas formuladas para enchidos cárneos.

Em ambas as matrizes, ao fim das 48 horas à 7 °C, as amostras inoculadas com *Lactobacillus* e *L. innocua* apresentaram um crescimento de *Listeria* sp., inferiores a 1 log¹⁰.

O crescimento efectivo de *Listeria*, em matriz de chouriço, nas amostras em que *Lactobacillus* e *L. innocua* foram inoculadas (32, 42 e 342), ocorreu ao final das 96 horas, após dois dias à temperatura de 20 °C, com uma variação de 1 log¹⁰ durante todo o ensaio para as três amostras. Estas amostras não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si ou para a amostra 2 (*L. innocua*) ao final do ensaio (96 horas). Entretanto, a amostra 32 apresentou uma contagem final inferior em 1 log¹⁰ UFC g⁻¹ às contagens das demais amostras onde *L. innocua* também tinha sido inoculada.

Já no ensaio com matriz cárneia sem condimentações, as amostras 420 (CV3C2 + *L. innocua*) e 3420 (P3B7 + CV3C2 + *L. innocua*) apresentaram valores de contagens finais superiores (6 log¹⁰ UFC g⁻¹) à amostra 20 (5,53 log¹⁰ UFC g⁻¹), mas apresentaram um menor diferencial ao longo do ensaio onde a amostra 20 (inoculada apenas com *L. innocua*) apresentou uma variância ao final do ensaio de 2,11 log¹⁰ enquanto as amostras conjugadas de *L. innocua* e *Lactobacillus* apresentaram variâncias de 1 log¹⁰ para as amostras 420 e 3420, e inferior a 1 log¹⁰ para a amostra 320 (*L. plantarum* + *L. innocua*).

Rodríguez e colaboradores (1994) relataram que alguns *Lactobacillus* possuem um papel bacteriostático em relação a estirpes de *L. monocytogenes*, não eliminando o patógeno mas apenas controlando seu crescimento (Rodríguez *et al.*, 1994). Estes autores referiram que a sua atuação é mais eficaz em temperaturas de 15, 24 e 32 °C em comparação com temperaturas de refrigeração de 4 e 8 °C (Rodríguez *et al.*, 1994). Amézquita & Brasheares (2002) avaliaram produtos prontos para consumo, onde em dois tipos de enchidos fermentados inoculados com *Lactobacillus* os teores de *L. monocytogenes* não apresentaram aumento ou reduções nos produtos, mesmo após 28 dias de armazenamento, a vácuo e a uma temperatura de 5 °C (Amézquita & Brasheares, 2002).

Apesar da melhor adaptação inicial de *L. innocua* na matriz de massa formulada de chouriço a 7°C, após este período, a 20 °C, com o crescimento e adaptação da microbiota tecnológica (BAL e SCN) nas matrizes o crescimento de *L. innocua* não foi tão eficaz. Nas amostras de matriz de chouriço (32, 42 e 342) e nas amostras de matriz cárneia sem condimentações (320, 420 e 3420), a variação de crescimento das 48 horas (7 °C) para as 72 horas (20 °C) foi inferior a 1 log¹⁰.

Das três amostras de matriz cárneia sem condimentações onde ocorreu o teste de competição foi a amostra inoculada com a estirpe P3B7 que apresentou o menor valor de

contagem final ($4,06 \log^{10}$ UFC g⁻¹) e a menor variação de crescimento entre as 0 e 96 horas (inferior a $1 \log^{10}$).

O menor crescimento de *Listeria* ao longo do ensaio na massa de chouriço controlo pode ser explicado pelo efeito dos ingredientes adicionados como o alho. Diferentes estudos desenvolvem o uso de alho ou extrato de alho como componentes bacteriostáticos quando adicionados a produtos cárneos. Sung e colaboradores (2014) relataram uma redução no crescimento de *L. monocytogenes* quando associou embalagens com atmosfera modificada com extrato de alho (Sung *et al.*, 2014). Sallam e colaboradores (2004) descrevem que a utilização de alho na sua forma natural, alho fresco, é mais eficiente quando comparada a utilização de pó de alho ou óleo de alho (Sallam *et al.*, 2004).

Estudos de Djenane *et al.* (2005) com carnes refrigeradas utilizando *L. sakei*, referiram que a inibição de *L. monocytogenes* foi mais eficaz a 25 °C. No 4 dia de ensaio a 25 °C *L. monocytogenes* apresentava um diferencial superior ($2 \log^{10}$) ao constatado a temperaturas de 3 e 8 °C (inferior a $1 \log^{10}$). Katle e colaboradores (2001) verificaram que a utilização de uma estirpe *L. sakei* produtor de bacteriocina isoladamente ou em conjugação com a mesma bacteriocina, em salmão fumado (10 °C) possui um maior efeito na inibição de *L. monocytogenes* (inoculada em $3 \log^{10}$ UFC g⁻¹) ao final de 28 dias, com um diferencial de até $4 \log^{10}$, enquanto aos 7 dias de ensaio essa variação foi inferior, de 2 e $4 \log^{10}$ para a utilização da estirpe de *Lactobacillus* e para a conjugação da estirpe e bacteriocina, respectivamente (Katle *et al.*, 2001).

Outro fator importante para o controlo de microrganismos deteriorativos e patogénicos é o pH. Nos ensaios realizados não houve redução significativa do pH em nenhuma das amostras contendo *Lactobacillus*. Apesar da presença de substrato de fácil utilização (dextrose) na matriz de massa formulada de chouriço, as condições durante os ensaios com ambas as matrizes não foi suficiente para que ocorresse uma diminuição de pH mais acentuada por produção de ácido lático das bactérias fermentadoras.

A incapacidade dos isolados de *Lactobacillus* na eficaz redução do pH pode ter sido influenciada pela escassez de substrato (açúcar) em ambas as matrizes e também pela multiplicação lenta a baixas temperaturas sem um rápido aumento das BAL e a consequente produção de ácido lático e redução do pH.

O pH em produtos cárneos fermentados pode chegar em valores de até 4,2 (Petäjä & Puolanne, 2007), enquanto as amostras testadas apresentaram valores de pH em torno de 6,0. Winkowski e colaboradores (1993) não observaram efeitos de inibição de *L. monocytogenes* pela redução do pH, por *Lactobacillus*, em matriz cárnea refrigerada a 4 e 10 °C durante 6 semanas de incubação (Winkowski *et al.*, 1993). Castellano & Vignolo (2006) também não relataram redução ou ação inibitória relacionada ao pH para *L. innocua* e *B. thermosphacta*, pela produção de ácido por estirpes de *Lactobacillus*, sendo os resultados finais iguais para todas as mostras (pH de 5,0) (Castellano & Vignolo, 2006).

A não redução do pH elimina um importante mecanismo de controlo de microrganismos deteriorativos e patogénicos. A queda do pH decorre da acumulação de ácido láctico que foi

metabolizado a partir de carboidratos da massa cárnea, permitindo que a fermentação ocorra (Lücke, 2000). A redução do pH também atua na capacidade de retenção de água, facilitando a secagem e reduzindo o A_w do produto (Työppönen *et al.*, 2003).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de culturas *starters* é essencial para o desenvolvimento de enchidos cárneos fermentados, seja à nível das suas características organolépticas ou em relação a sua segurança. O desenvolvimento de novas culturas *starters* visa a identificação de novas estirpes que possuam propriedades distintas tanto para a qualidade quanto para a segurança do produto.

A biodiversidade presente em produtos cárneos fermentados é composta por uma comunidade bacteriana muito bem adaptada à matéria prima, o desenvolvimento de novas culturas *starters* depende do estudo da interação entre a microbiota tecnológica e a microbiota bacteriana presente na matéria prima.

No presente estudo foram testadas três estirpes de *Lactobacillus* isoladas previamente de produtos cárneos, duas estirpes constituíam *L. plantarum* (P3B7 e P05-15) e uma *L. sakei* (CV3C2), em relação à sua actuação de biopreservação em enchidos fermentados, avaliando primeiramente seu potencial de inibição para com a microbiota deteriorativa e patogénica e a produção de ácido láctico, para então duas estirpes serem seleccionadas para a realização dos ensaios *in vitro*.

Nos ensaios preliminares, na avaliação do potencial bacteriocinogénico o isolado *L. plantarum* P3B7 apresentou os maiores halos de inibição para a microbiota deteriorativa, patogénica mas também tecnológica, seguido pelo isolado *L. plantarum* P05-15 e *L. sakei* CV3C2. Na avaliação da produção de ácido láctico, o isolado P05-15 foi a maior produtora, entretanto os isolados P3B7 e CV3C2 apresentaram uma relação de produção de L(+)/D(-) mais adequada (5:8) para produção de alimentos prontos para consumo.

Durante a evolução da microbiota em ambas as matrizes, os isolados de *Lactobacillus* utilizados separadamente ou em conjugação não inibiram o crescimento da microbiota tecnológica indígena da matéria prima (SCN). O isolado que apresentou melhor crescimento e adaptação em ambas as matrizes foi o *L. plantarum* P3B7. Quando utilizado isoladamente em matrizes cárneas ocorreu um menor crescimento de *Listeria* sp.. A inibição de AT foi também mais efectiva na utilização isolada de P3B7 e na conjugação de P3B7 + CV3C2 em matriz de massa formulada de chouriço enquanto em matriz carne sem condimentação foi mais efectiva a utilização isolada de *L. sakei* CV3C2.

Em ambos os ensaios o pH foi medido para as amostras que não continham *L. innocua* (1, 10, 3, 30, 34 e 340), nenhuma das amostras contendo *Lactobacillus* apresentou decréscimo no pH ao decorrer das 96 horas de ensaios. Apesar da presença de substrato, as condições fornecidas para que ocorresse a produção de ácido láctico não foram suficientemente satisfatórias, eliminando assim um importante fator das BAL para o controlo de microrganismos deteriorativos e patogénicos, sendo nossa convicção que a capacidade inibitória se deveu à produção de bacteriocinas.

De modo geral as três estirpes testadas apresentaram potencial bacteriocinogénico para microrganismos deteriorativos e patogénicos presentes na matéria prima, dentre os dois

microrganismos testados nos ensaios *in vitro* o *L. plantarum* P3B7 apresentou os resultados mais desejáveis.

O presente estudo demonstrou a capacidade bioprotectora de estirpes de *Lactobacillus*, previamente isoladas de produtos cárneos, demonstrando seu potencial bacteriogénico para o controlo de microrganismos deteriorativos e patogénicos, em especial apresentou-se o potencial de inibição de *Listeria monocytogenes* (representada pela sua variante não patogénica *L. innocua*) destas estirpes, em circunstâncias que extrapolam condições normais de competição.

REFERÊNCIAS

- Aarnikunnas, J., Von Weymarn, N., Ronnholm, K., Leisola, M. & Palva, A. (2003). Metabolic engineering of *Lactobacillus fermentum* for production of manitol and purê L-lactic acid or pyruvate. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.82(nº6), pp. 653 – 663.
- Abo-Amer, A.E. (2007). Characterization of a Bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from egyptin home-made yogurt. *ScienceAsia*, Vol. 33, pp. 313 – 319.
- Ahn, D. U. & Min, B. (2007). Packaging and Storage. In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed.), 576 pp., F. Toldrá (Ed.), Oxford, Blackwell, pp. 289 – 300. (ISBN: 9780813814773).
- Aksu, N.I., K., M. & Oz, F. (2008). Effect Of *Lactobacillus Sakei* And *Staphylococcus Xylosus* On The Inhibition Of *Escherichia Coli* O157:H7 In Pastirma, A Dry-Cured Meat Product. *Journal of Food Safety*, Vo.28(nº1), pp. 47 – 58.
- Amézquita, a. & Brashears, M.M. (2002). Competitive Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat Meat Products by Acid Lactic Bacteria. *Journal of Food Protection*, Vol.65(nº2), pp. 316 – 325.
- Ammor, M.S. & Mayo, B. (2006). Selection criteria for latic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, Vol.76, pp. 139 –146.
- Andersen, L. (1995). Biopreservation with FloraCarn L-2. *Fleischwirtschaft*, Vol.75(nº11), pp. 1327 – 1329.
- Andrade, R.B., Gemelli, T., Onder, L.P.O., Cristina, K., Brito, T., Barboza, A.A.L. & Brito, B.G. (2010). Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campilobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. *Arquivos do Instituto Biológico*, Vol. 77 (nº 4), pp. 741 – 750.
- Andrés, A., Barat, J. M., Grau, R. & Fito, P. (2007). Principles of Drying and Smoking. In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed.), 576 pp., F. Toldrá (Ed.), Oxford, Blackwell, pp. 37 – 48. (ISBN: 9780813814773).
- Atanassova, V., Meindl, A. & Ring, C. (2001). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham – a comparison of cassivel culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.68, pp. 105 – 113.
- Azevedo, I., Regalo, M., Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T. & Gibbs, P.A. (2005). Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control*, Vol.16, pp. 121 – 124.
- Barbut, S. (2007). Texture. In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed.), 576 pp., F. Toldrá (Ed.), Oxford, Blackwell, pp. 217 – 226. (ISBN: 9780813814773)
- Beck, H. (2005). Branched-chain fatty acids biosynthesis in a branched-chain amino acid aminotransferase mutant of *Staphylococcus carnosum*. *FEMS Microbiology Letters*, Vol.243, pp.37 – 44.
- Bernardi, S., Golineli, B.B. & Contreras-Castillo, C.J. (2010). Aspectos da aplicação de culturas starter na produção de embutidos cárneos fermentados. *Brazilian Journal of Food Technology*, Vol.13(nº2), pp. 133 – 140.
- Bonsaglia, E.C.R., Silva, N.C.C., Júnior, A.F., Júnior, J.P.A., Tsunemi, M.H. & Rall, V.L.M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, Vol.35, pp. 386 – 391.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. & Vidal-Carou, M.C. (2001). Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.66, pp. 185 – 189.
- Bruckner, S., Albretch, A., Petersen, B. & Kreyenschmidt, J. (2012). Characterization and comparison of Spoilage Processes in Fresh Pordk and Poultry. *Journal of Food Quality*, Vol. 35(nº 5), pp. 372 – 382.
- Caldara, F.R., Santos, L.S., Nieto, V.M.O.S., Foppa, L., Santos, R.K.S., Paz, I.C.L.A., Garcia, R.G. & Naas, I.A. (2014). Microbiological growth in normal and PSE pork stored under refrigeration. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Vol.15 (nº 2), pp. 459 – 469.
- Calderon, D.F. & Furlaneto, S.M.P. (1990). Análise bacteriológica de carnes suínas comercializadas em açougues da cidade de São Paulo. *Revista de Microbiologia*, Vol. 21, pp. 331 – 336.

- Carbonera, N. & Espirito Santo, M.L.P. (2010). Atividade do *Lactobacillus plantarum* na preservação da anchoita (*Engraulis anchoita*) fermentada. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, Vol.6(nº2), pp. 201 – 207.
- Carr, F.J., Chill, D. & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol.28, pp. 281–370.
- Carvalho, A., Eusébio, C., Silva, J., Gibbs, P. & Teixeira, P. (2010). Influence of *Listeria innocua* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, Vol.21(nº11), pp. 1492 – 1496.
- Carvalho, K.G., Bambirra, F.H. S., Kruger, M.F., Barbosa, M.S., Oliveira, J.S., Santos, A.M.C., Nicoli, J.R., Bemquerer, M.P., Miranda, A., Salvucci, E.J., Sesma, F.J.M. & Franco, B.D.G.M. (2010). Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol.37, pp. 381 – 390.
- Castellano, P. & Vignolo, G. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Letters in Applied Microbiology*, Vol.43(nº2), pp. 194 – 199.
- Chaillou, S., Christeans, S., Rivollier, M., Lucquin, I., Champomier-Vergès, M.C. & Zagorec, M. (2013). Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef. *Meat Science* [on line]. pp. 7. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174013004932> >. Acessado em 18 de Setembro de 2013.
- Chen, Y. (2012). *Listeria monocytogenes*. In: *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins* (2nd ed.), 352 pp., Lampel, K.A., Al-Khaldi, S. & Cahill, S.M. (Eds.), Food and Drug Administration, pp. 99 – 103 (ISBN: 978-1588082664)
- Cirolini, A., Fries, I.L.M., Terra, N.N., Milani, L.I.G., & Urnau, D. (2009). Isolamento e caracterização de *Staphylococcus xylosus* de salames coloniais: um estudo preliminar. *Alimentação e Nutrição Araraquara*, Vol.20(nº 2), pp 307 – 311.
- Codex Alimentarius Commission (2007). *Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of Listeria monocytogenes in Ready-to-eat Foods*. Última modificação em 2009. Disponível em: < <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/> >. Acessado em 23 de Maio de 2014.
- Concconcilli, P.S. (2007). Starter Cultures: Bacteria. In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed.), 576 pp., F. Toldrá (Ed.), Oxford, Blackwell, pp. 137 – 146. (ISBN: 9780813814773).
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol.46, pp. 269 – 280.
- Connolly, E. & Lonnerdal, E. (2004). D(-)-Lactic Acid-Producing Bacteria: Safe to use in infant formulas. *Nutrafoods*, Vol.3(nº3), pp. 37 – 49.
- Considine, K.M., Sleator, R.D., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F. & Hill, C. (2011). A role for proline synthesis and transport in *Listeria monocytogenes* barotolerance. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.110(nº5), pp.1187 – 1194.
- Corsetti, A. & Settanni, L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, Vol.40, pp. 539 – 558.
- Cotter, P.D., Hill, C. & Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food. *Nature Reviews: Microbiology*, Vol 3, pp. 777 – 788.
- Dahlqvist, G., Guillen-Anaya, M.A., Vincent, M.F., Thissen, J.P. & Hainaut, P. (2013). D-lactic acidosis: an unusual cause of encephalopathy in a patient with short bowel syndrome. *Acta Clinica Belgica*, Vol.68(nº3), pp. 229 – 31.
- De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. & Whitman, W.B. (Ed.) (2009). The Firmicutes. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed.), 1450 pp., Springer, Vol. 3, 1442 pp. (ISBN: 978-0387950419).
- Decreto-Lei nº 560/99 de 18 de Dezembro. Diário da República nº 293 – I Série-A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Portugal: Lisboa.
- Diez, J. & Patarata, L. (2013). Behavior of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Chouriço de Vinho, a dry fermented sausage made from wine-marinated meat. *Journal of Food Protection*, Vol.76, pp. 588 – 94.

- Djenane, D., Martinez, L., Blanco, D., Yanguela, J., Beltrán, J.A. & Roncáles, P. (2005). Effect of lactic acid bacteria on extension of shelf life and growth of *Listeria monocytogenes* in beef steaks stored in CO₂ rich atmosphere. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol.36, pp. 405 – 412.
- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F. & Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial microbiota from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*, Vol.69, pp 307 – 317.
- Duché, O., Frédéric, T., Glaser, P. & Labadie, J. (2002). Salt Stress Proteins Induced in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68(nº4), pp. 1491 – 1498.
- Durlu-Ozkaya, F., Ayhan, K. & Vural, N. (2000) Biogenic amines produced by *Enterobacteriaceae* isolated from meat products. *Meat Science*, Vol.58, pp. 163 – 166.
- Egan, A.F., Shay, B.J. & Rogers, P.J. (1989). Factors affecting the production of hydrogen sulphide by *Lactobacillus sake* L13 growing on vacuum packaged beef. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol.67(nº 3), pp. 255 – 262.
- Enan, G., Alalyan, S., Abdel-salam, H.A. & Debevere, J. (2002). Inhibition of *Listeria monocytogenes* LMG10470 by plantaricin UG1 in vitro and in beef meat. *Nahrung/Food*, Vol.46(nº6), pp. 411 – 414.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P. & Villani, F. (2009). Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential in vitro and in Beef. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.75(nº7), pp. 1990 – 2001.
- Espírito Santo, M.L.P., Lisboa, C., Alves, F.G., Martins, D., Beirão, L.H., Sant'anna, E.S. & Franco, B.D.G. M.(2005). Effect of different levels of sodium chloride and glucose on fermentation of sardines (*Sardinella brasiliensis*) by *Lactobacillus sakei* 2a. *Brazilian archives of biology and technology*, Vol.48(nº1), pp. 42 – 52.
- Esteves, A.S.M.F. (2005). *Perigos microbiológicos em alheira – Principais vias de contaminação por Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens e Salmonella spp.* Dissertação de doutoramento em Ciências Veterinárias. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. pp. 280.
- Feiner, G. (2006). *Meat products handbook – Practical Science and technology* (1st ed.), 672 pp., Woodhead Publishing Limited (ISBN: 9781845690502).
- Fiorentini, A.M., Sant'Anna, E.S., Porto, A.C.S., Mazo, J.Z. & Franco, B.D.G.M. (2001). Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol.32(nº1), pp. 42 – 44.
- Fraqueza, M.J., Barreto, A.S., Ribeiro, A.M. (2007). HACCP. In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed.), 576 pp., F. Toldrá (Ed.), Oxford, Blackwell, pp. 513 – 543. (ISBN: 9780813814773).
- Fries, R. (2007). International Standards: Europe. In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed.), 576 pp., F. Toldrá (Ed.), Oxford, Blackwell, pp. 273 – 288. (ISBN: 9780813814773).
- Fuzihara, T.O. & Franco, B. D. G. M. (1993). Bactérias patogênicas e bactérias indicadoras de higiene em carne suína comercializada em Santo André – São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Vol.13(nº1), pp. 77 – 88.
- Gamble, H.R. (1997). Parasites associated with pork and pork products. *Revue Scientifique et Technique de L'office International des Epizooties*, Vol.16(nº2), pp. 496 – 506.
- Gamboa-marin, A., Buitrago, M., Pérez-Pérez, K., Mercado, M., Poutou-Piñales, R. & Carrascal-Camacho, A. (2012). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in pork-meat and other processed products from the Colombian swine industry. *Revista MVZ Córdoba*, Vol.17(nº1), pp. 2827 – 2833.
- Gandhi, M. & Chikindas, M.L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, Vol 113, pp. 1- 15.
- Garriga, M. & Aymerich, T. (2007). The Microbiology of Fermentation and Ripening. Em F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1^a ed.) (pp. 125 – 135). Oxford: Blackwell.
- Goffin, P., Deghorian, M., Mainardi, J., Tytgat, I., Champomier-Verges, M., Kleerebezem, M. & Hols, P. (2008). Lactate Racemization as a Rescue Pathway for Supplying D-Lactate to the Cell Wall Biosynthesis Machinery in *Lactobacillus plantarum*. *Journal Of Bacteriology*, Vol.187(nº19), pp. 6750 – 6761.
- Goh, S.G., Leili, A., Kuan, C.H., Loo, Y.Y., Lye, Y.L., Chang, W.L., Soopna, P., Najwa, M.S., Tang, J.Y.H., Yaya, R., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y., Son, R. (2014). Transmission of *Listeria monocytogenes* from raw chicken to cooked chicken meat through cutting boards. *Food Control*, Vol. 37, pp. 51 – 55.
- Goja, A.M., Ahmed, T.A.A., Saeed, S.A.M. & Dirar, H.A. (2013). Isolation and identification of *Staphylococcus* spp. in fresh beef. *Pakistan Journal of Nutrition*, Vol.12(nº2), pp. 114 – 120.

- Gonzalez, A.E., García, H.H., Gilman, R.H. & Tsang, V.C.W., Cisticercosis Working Group in Peru (2003). Control of *Taenia solium*. *Acta Tropica*, Vol.87, pp. 103 – 109.
- González, D., Vitas, A.I., Díez-Leturia, M. & García-Jálon, I. (2013). *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood in Spain: Study of prevalence and temperatures at retail. *Food Microbiology*, Vol. 36, pp. 374 – 378.
- Gravesen, A., Diao, Z., Voss, J., Budde, B.B. & Knochel, S. (2004). Differential inactivation of *Listeria monocytogenes* by D- and L-lactic acid. *Letters in Applied Microbiology*, Vol.39, oo. 528 – 532.
- Hammes, W.P. & Hertel, C. (1998). New Developments in Meat Starter Cultures. *Meat Science*, Vol.49(nº1), pp. S125 – S138.
- Hammes, W.P., Bantleon & Min, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, Vol.87(nº1-2), pp. 165 – 174.
- Hammes, W.R. & Hertel, C. (2009). Genus I. *Lactobacillus*. In: The Firmicutes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed.), 1450 pp., De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. & Whitman, W.B., (Eds.), Springer, Dordrecht, Heidelberg London, New York, Vol. 3, pp. 464 – 512. (ISBN: 978-0387950419).
- Heinz, G. & Hautzinger, P. (2007). Meat processing technology for small to medium-scale producers. Food and Agriculture Organization, Bangkok. pp. 68; 115-126. Disponível em: < <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ai407e/> >. Acessado em Jun. 30, 2013.
- Hellstrom, S., Laukkanen, R., Siekkinen, K.M., Ranta, J., Majjala, R. & Korkeala, H. (2010). *Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms. *Journal of Food Protection*, Vol.73(nº4), pp. 641 – 648.
- Henriques, A.R., Telo da Gama, L. & Fraqueza, M.J. (2014). Assessing *Listeria monocytogenes* presence in Portugal ready-to-eat meat processing industries based on hygienic and safety audit. *Food Research International*, Vol.63, pp. 81 – 88.
- Heras, A., Cain, R.J., Biebelecka, M.K. & Vázquez-Boland, J.A. (2011). Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology*, Vol.14, pp. 118 – 127.
- Hernandez-Milian, A. & Payeras-Cifre, A. (2013). What is new in Listeriosis?. *BioMed Research International*, Vol.2014, pp. 7.
- Hino, T. & Kuroda, S. (1993). Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. *Applied and Environment Microbiology*, Vol.59, pp. 255 – 259.
- Holzappel, W.H., Geisen R. & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.24(nº3), pp. 343 – 362.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation of Meat and Meat Products. *Meat Science*, Vol.49(nº 1), pp. S139 – S150.
- Hutkins, R.W. (2006). *Microbiology and technology of fermented foods* (1st ed.), 473 pp., Oxford, Blackwell Publishing, pp. 207 – 232 (ISBN: 9780813800189).
- ICMSF (International Commission for Microbial Specifications in Food) (1983). *Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico*. Zaragoza, 432 pp., Acibia (Ed.), Zaragoza, pp. 231 (ISBN: 84-200-0517-7).
- Indrawattana, N., Nibaddhasobon & Chaicumpa, W. (2011). Relevance of *Listeria monocytogenes* in Raw Meats Marketed in Bangkok and Characterization of the Isolates by Phenotypic and Molecular Methods. *Journal of Health, Population and Nutrition*, Vol.29(nº1), pp. 26 – 38.
- ISO 11290 (1996). Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species – Part 1: Detection method., International Organization for Standardization, Switzerland
- ISO 13720 (2010). Meat and meat products -- Enumeration of presumptive *Pseudomonas* spp. International Organization for Standardization, Switzerland.
- ISO 15214 (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30 degrees C. International Organization for Standardization, Switzerland.
- ISO 21528-2:(2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method. International Organization for Standardization, Switzerland.

- ISO 4833: (2003) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C. International Organization for Standardization, Switzerland.
- ISO 6887 (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. International Organization for Standardization, Switzerland.
- Jamali, H. & Thong, K.L. (2014). Genotypic characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat foods. *Food Control*, Vol.44, pp. 1 – 6.
- Jay, J.M. (2000). Food Born Listeriosis. In: *Modern Food Microbiology* (6th ed.), 625 pp., Aspen Publishers, pp. 485 – 504 (ISBN: 083421671X).
- Jay, J.M. (2005) Listerioses de origem animal. In: *Microbiologia de alimentos* (6^a ed.), 712 pp., Artmed (Ed.), Porto Alegre, pp. 517 – 542 (ISBN: 9788536305073).
- Jian, L., Chen, J., Xu, J., Zhang, X., Wang, S., Zhao, H., Vongxay, K. & Fang, W. (2008). Virulence characterization and genotypic analyses of *Listeria monocytogenes* isolates from food and processing environments in eastern China. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.121, pp. 53 – 59.
- Joerger, M.C. & Klaenhammer, T.R. (1990). Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *Journal of Bacteriology*, Vol.172(nº11), pp. 6339 – 6347.
- Jönck, F., Gava, A., Traverso, S.D., Luciola, J., Furlan, F.H. & Gueller, E. (2013). Intoxicação espontânea e experimental por nitrato/nitrito em bovinos alimentados com *Avena sativa* (Aveia) e/ou *Lolium* spp. (azevém). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Vol. 33(nº9), pp. 1062-1070.
- Jones, R.J., Zagorec, M., Brightwell, G. & Tagg, J.R. (2009). Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during prolonged storage. *Food Microbiology*, Vol.26, pp. 879 – 881.
- Kang, T.S., Krober, D.R. & Tanaka, T. (2013). Influence of oxygen on NADH recycling and oxidative stress resistance systems in *Lactobacillus panis* PM1. *AMB Express*, Vol.3, pp. 10 – 19.
- Katikou, O., Ambrosiadis, I., Georgantelis, D., Koidis, P. & Georgakis, S.A. (2005). Effect of *Lactobacillus*-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances producing ability on microbiological chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.99, pp. 1303 – 1313.
- Katle, T., Moretro, T., Aasen, I.M., Holck, A., Axelsson, L. & Naterstad, K. (2001). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiology*, Vol.18, pp. 431 – 439.
- Keenan, T.W. & Lindsay, R.C. (1967). Diacetyl Production and Utilization by *Lactobacillus* Species. *Journal of Dairy Science*, Vol.51(nº 2), pp. 188 – 191.
- Kievit, T.R. & Iglewski, B.H. (2000). Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity*, Vol. 68(nº9), pp. 4839 – 4849.
- Kongkiattikajorn, J. (2013). Potential of Fermented Sausage - Associated Lactic Acid Bacteria to Degrade Biogenic Amines During Storage (2013). In: *Lactic Acid Bacteria – R & D for food, Health and Livestock Purposes* (1st ed.), 670 pp., Kongo, M. (Ed.), pp. 97 – 128 (ISBN: 9789535109556).
- Koo, O.K., Ndahetuye, J.B., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C. & Crandall, P.G. (2014). Influence of *Listeria innocua* on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel and aluminum surfaces. *Food Control*, Vol.39, pp. 135 – 138.
- Kröckel, L. (2013). The role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat and Meat Products (2013). In: *Lactic Acid Bacteria – R & D for food, Health and Livestock Purposes* (1st ed.), 670 pp., Kongo, M. (Ed.), pp. 129 – 152 (ISBN: 9789535109556).
- Lake, R., Hudson, A., Cressey, P., & Nortje, G. (2002). Risk profile: *Listeria monocytogenes* in processed ready-to-eat meats (prepared as part of a New Zealand Food Safety Authority Contract for Scientific Services). Institute of Environmental Science & Research Limited, *Christchurch Science Centre*, pp. 11 – 17.
- Lebert, I., Leroy S. & Talon, R. (2007a). Microorganisms in Traditional Fermented Meats. In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed.), 576 pp., F. Toldrá (Ed.), Oxford, Blackwell, pp. 113 – 124. (ISBN: 9780813814773)

- Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Lebert, A., Chacornac, J.P., Bover-Cid, S., Vidal-carou, M.C. & Talon, R. (2007b). Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science*, Vol.76, pp. 112 – 122.
- Leitch, E.C.M. & Stewart, C.S. (2002). Escherichia coli O157 and Non-O157 Isolates Are More Suceptible to L-Lactate than to D-Lactate. *Applied and Enviromental Microbiology*, Vol.68(nº2), pp. 4676 – 4678.
- Leroy, F. & Vuyst, L. (2003). A combined model to predict the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494. *Applied and Enviromental Microbiology*, Vol.69(nº2), pp. 1093 – 1099.
- Leroy, F. & Vuyst, L. (2005). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.106, pp. 270 – 285.
- Leroy, F., Verluyten, J. & Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.106, pp. 270 – 285.
- Lorber, B. (2007). Listeriosis. Em Goldfine, H. & Shen, H. (ed.) (2007). *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response*. (pp. 13 – 32). Springer.
- Lücke, F.K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, Vol.56, pp. 105 – 115.
- Ludwig, W., Schleifer, K.H. & Whitman, W.B. (2009a). Order II. *Lactocillales*. In: The Firmicutes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed.), 1450 pp., De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. & Whitman, W.B., (Eds.), Springer, Dordrecht, Heidelberg London, New York, Vol. 3, pp. 464-512 (ISBN: 9780387950419).
- Ludwig, W., Schleifer, K.H. & Whitman, W.B. (2009b). Family III. *Listeriaceae*. The Firmicutes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed.), 1450 pp., De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. & Whitman, W.B., (Eds.), Springer, Dordrecht, Heidelberg London, New York, Vol. 3, pp. 244 – 268 (ISBN: 9780387950419).
- Mano, S.B., Pereda, J.A.O. & Fernando, G.D.G. (2002). Aumento da vida útil e microbiologia da carne suína embalada em atmosfera modificada. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, Vol.22(nº1), pp. 1 – 10.
- Matos, T.J.S., Bruno-Soares, A. & Azevedo, A.A. (2013). Microbial spoilage of portuguese chouriço along shelf life period. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol.44(nº1), pp. 105 – 108.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G. & Villani, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative *staphylococci* from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Science*, Vol.67, pp.149 – 158.
- McClure, P.J., Roberts, T.A. & Oguru, P.O. (1989). Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and liquid medium. *Letters of Applied Microbiology*, Vol.9, pp. 95 – 99.
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T. & Gibbs, PA. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, Vol. 21 (nº2), pp. 213 – 216.
- Mérimée, P. (1829). *La Chronique du temps de Charles IX*. Os grandes romances históricos, Vol.4., pp. 7 – 220. Éditions Ferni.
- Miller, M.B. & Bassler, B.L. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 55, pp. 165 – 99.
- Minami A, Chaicumpa W, Chongsanguan M, Samosornsuk S, Monden S, Takeshi K, Makino, S. & Kawamoto, K. (2010). Prevalence of foodborne pathogens in open markets and supermarkets in Thailand. *Food Control*, Vol.21, pp. 221 – 226.
- Montville, T.J. & Chen, Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.50, pp. 511 – 519.
- Moreno, L.Z. (2013). *Pesquisa de genes de virulência em cepas de Listeria monocytogenes e Listeria innocua originárias de carne suína e ambiente de abatedouros e açougues*. Tese de mestrado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, pp. 36 – 41.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K., Srivastava, A. (2004). L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Eletric Journal of Biotechnology*, [on line], Vol.7(nº2). Disponível em: < <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol7/issue2/full/7/7.pdf> >. Acessado em 10 de Julho de 2014.

- Navratilova, P., Schlegelova, J., Sustackova, A., Naptravnikova, E., Lukasova, J. & Kliova, E. (2004). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in milk, meat and foodstuff of animal origin and the phenotype of antibiotic resistance of isolated strains. *Veterinární Medicína*, Vol.49(nº7), pp. 243 – 252.
- Nelson, L.D. & Cox, M.M. (2004). Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. In: *Lehninger: Principles of Biochemistry* (4th ed.), 1100 pp., Nelson, L.D. & Cox, M.M (Eds.), W. H. Freeman, pp. 690 – 750 (ISBN: 9780716743392)
- Newton, K.G. & Gil, C.O. (1978). The development of the anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol.44, pp. 91 – 95.
- Nieminen, T.T., Vihavainen, E., Paloranta, A., Lehto, J., Paulin, L., Auvinen, P., Solismaa, M. & Björkroth, K.J. (2011). Characterization of psychrotrophic bacterial communities in modified atmosphere-packed meat with terminal restriction fragment length polymorphism. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.144, pp. 360 – 366.
- Norma Portuguesa nº 589 (2008). Norma Portuguesa 589:2008. Chouriço de carne – Definição, classificação, características e acondicionamento. Instituto Português de Qualidade, p. 1. Lisboa.
- Norwood, D.E. & Gilmour, A. (2000). The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.88, pp. 512 – 520.
- Nychas, E. G-J., Skandamis, P.N., Tassou, C.C. & Koutsoumanis, K.P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, Vol.78, pp. 77 – 89.
- Ockerman, H.W. & Basu, L. (2007). Production and Consumption of Fermented Meat Products. Em In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed.), 576 pp., F. Toldrá (Ed.), Oxford, Blackwell, pp. 9 – 16. (ISBN: 9780813814773).
- Papamanoli, E., Kotzekidou, P., Tzanetakis, N. & Litopoulou, E.T. (2002). Characterization of *Micrococcaceae* isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiology*, Vol.19, pp. 441 – 449.
- Paramithiotis, S., Drosinos, E.H., Sofos, J.N. & Nychas G.E. (2010). Fermentation: Microbiology and Biochemistry. In: *Handbook of Meat Processing* (1st ed.), 561 pp., Toldrá, F. (Ed.) Wiley-Blackwell, pp. 185 – 198. (ISBN: 9780813821825).
- Petäjä-Kannine, E. & Puolanne, E. (2007) Principles of Meat Fermentation. In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed.), 576 pp., F. Toldrá (Ed.), Oxford, Blackwell, pp. 31 – 36. (ISBN: 9780813814773).
- Pitcher, D.G., Saunders, N.A. & Owen, R.J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters Applied Microbiology*, Vol.8, pp.151 – 156.
- Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P. (2007). Invasion of Host Cells by *Listeria monocytogenes*. In: *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response*, Goldfine, H. & Shen, H. (Ed.), 287 pp., Springer, pp. 159 – 179 (ISBN: 9780387493763).
- Pociecha, J. (1990). *Listeria monocytogenes* in meat and meat products - an unwanted Cinderella or a real menace?. *Surveillance*, Vol.17(nº2), pp.7 – 13.
- Quinta Da Portela (2012). *Chouriço de Carne Tradicional – Ficha Técnica e Sistema HACCP*. Disponível em: <http://www.informos.com/basedados/files/Chouri%C3%A7o%20Tradiciona%20Carne-20121111-232219.pdf> >. Acedido em 20 de setembro de 2013.
- Radulović, Z., Živković, D., Mirković, N., Petrušić, M., Stajić, S., Perunović, M. & Paunović, D. (2011). Effect of probiotic bacteria on chemical composition and sensory quality of fermented sausages. 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11). *Procedia Food Science*, Vol.1, pp. 1516 – 1522.
- Raposo, M.F.J., Silva, J.V., Neri, M. & Morais, R.M.S.C. (2007). Salicórnica como produto fermentado: desenvolvimento de condições ótimas para um processo controlado. *Revista Iberoamericana de Tecnologia Postcosecha*, Vol.8(nº2), pp. 129 – 136.
- Ray, B. (2005). *Fundamental Food Microbiology* (3rd ed.), 663 pp., CRC Press (ISBN: 9781466564435).
- Regulamento (CE) Nº 1141/2007 da Comissão de 5 de dezembro de 2007. Jornal Oficial nº L 322/12 de 07/12/2007, 18 pp..
- Reid, D.S. & Fennema, O.R. (2010). Water and Ice. In: *Química de Alimentos de Fennema* (4^a ed.), 900 pp., Damodaran, S., Parkin, K.L. & Fennema, O.W. (Eds.), Artmed Editora, Porto Alegre, pp. 18 – 77 (ISBN: 9788536322483).

- Riley, M.A. & Wertz, J.E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, Vol.84, pp. 357 – 364.
- Rodríguez, J.M., Sobrino, O.J., Moreira, W.L., Fernández, M.L., Cintas, L.M., Casaus, P., Sanz, B. & Hernández, P.E. (1994). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sake* strains of meat origin. *Meat Science*, Vol.38(nº1), pp. 17 – 26.
- Ruesca, N.M. (2012). *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos LPC. Resistencia a los antibióticos. Tese de mestrado, Universidade de Zaragoza – ES, 65 pp.. Disponível em: < <http://zaguan.unizar.es/TAZ/VET/2012/8543/TAZ-TFM-2012-579.pdf> >. Acessada em 04 de Agosto de 2014.
- Saad, S.M.I. & Franco, B.D.G.M. (1999). Influence of raw meat natural background microbiota on growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Revista de Microbiologia*, Vol.30, pp. 272 – 277.
- Sallam, K., Ishioroshi, M & Samejima, K. (2004). Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *Lebenson Wiss Techlogy*, Vol.37(nº8), pp. 849 – 855.
- Saraiva, C.M.T. (2008). *Influência do pH final e tipo de embalagem na conservacao de carne de bovino da raça maronesa – Parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais e fracção volátil*. Tese de Doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real., pp. 272.
- Sawitzki, M.C., Fiorentini, A.M., Brod, F.C.A., Tagliari, C., Bertol, T.M., Arisi, A.C.M. & Sant'Anna, E.S. (2009). Phenotypic characterization and species-specific PCR of promising starter culture strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from naturally fermented sausages. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 38 (nº3), pp. 547 – 552.
- Sawitzki, M.C., Fiorentini, A.M., Cunha Junior, A., Bertol, T.M. & Sant'ana, E.S. (2008). *Lactobacillus plantarum* AJ2 isolated from naturally fermented sausage and its effects on the technological properties of Milano-type salami. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, Vol.28(nº3), pp. 709 – 717.
- Schillinger, U. & Lücke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Enviromental Microbiology*, Vol 55(nº8), pp. 1901 – 1906.
- Schlech, W.F. (2000). Foodborne Listeriosis. Em Acheson, D. (Ed) (2000). *Special Section: Food Safety. Clinical Infectious Diseases* (Vol.31) (pp. 770 – 775). University of Chicago Press.
- Sena, C.M., Moedas, A.R., Nunes, E., Matafome, P. & Seica, R. (2008). Efeitos do metilglioxal na disfunção endotelial associada a diabetes tipo 2. *Revista Portuguesa de Diabetes*, Vol.3(nº1), pp. 57, Supl: 57 – 104.
- Shelf, L.A. (1983). Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*, Vol.6, pp. 29 – 44.
- Silva, M.V. (2003). *Produtos cárneos tradicionais: enchidos e produtos curados. Manual de Segurança Alimentar*. AESBUC/UCP, 34 pp.. Disponível em: < <http://www.esac.pt/noronha/manuais/manuais.htm> >. Acessado em 27 de Setembro de 2013.
- Silva, V.L.M., Aquiles, C., Torre, C., Mársico, E.T., Mano, S.B. & Conte Jr., C.A. (2013). Aminas Biogénicas como Indicadores de Qualidade de Salames e Produtos Cárneos Fermentados. *Centro Científico Conhecer*, Vol.9(nº16), pp. 69 – 84.
- Simon, M.C., Gray, D.I. & Cook, N. (1996). DNA Extraction and PCR Methods for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Salmon. *Applied and Enviromental Microbiology*, March 1996, pp. 882 – 824.
- Simonová, M., Strompfová, V., Marcinakova, M., Laukov, A., Vesterlund, S., Moratalla, M.L., Bover-Cid, S. & Vidal-Carou, C. (2006). Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. *Meat Science*, Vol.73, pp. 559 – 564.
- Skalka, B. (1986). Bacteriocin Activity of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and Coagulase-Negative *Staphylococcus* strains. *Acta Veterinaria Brno*, Vol.55, pp. 65 – 72.
- Skalka, B., Pillich, J., Pospíšil, L. (1986). New Possibilities of Staphylococcal Detection in the Exfoliatin-Producing Strains of *Staphylococcus aureus*. *Zentralblatt für bakteriologie und hygiene*, Vol. 254, pp. 34 – 41.
- Smaoui, S.; Elleuch, L.; Bejar, W.; Karray-Rebai, I.; Ayadi, I.; Jaouadi, B.; Mathieu, F.; Chouayekh, H.; Bejar, S. & Mellouli, L. (2010). Inhibition of fungi and gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol.162 (nº 4), pp. 1132 – 1146.
- Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol.70, pp. 331 – 345.

- Straub, B.W., Kicherer, M., Schilcher, S.M. & Hammes, W.P. (1995). The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung (Journ. Of Invest. Food and Resear.)*, Vol.201(nº1), pp. 79 – 82.
- Sunesen, L.O. & Stahnke, L.H. (2003). Mould starter culture for dry sausages – selection, application and effects. *Meat Science*, Vol.65, pp. 935 – 948.
- Sung, S.Y., Sin, L.T., Tee, T.T., Bee, S.T., Rahmat, A.R. & Rahman, W.A. (2014). Controlo of bacteria growth on ready-to-eat beef loaves by antimicrobial plastic packaging incorporated with garlic oil. *Food Control*, Vol.39, pp. 214 – 221.
- Talon, R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., Drosinos, E.H., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, Patarata, L. & Lauková, A. (2007a). Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Science*, Vol.77, pp. 570 – 579.
- Talon, R., Leroy, S. & Lebert, I. (2007b). Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Science*, Vol.77, pp. 55 – 62.
- Thévenot, D., Dernburg, A. & Vernozy-Rozand, C. (2006). An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.101 pp. 7 – 17.
- Todorov, D.S., Oliveira, R. & Vaz-Velho, M. (2012). Media optimization of bacteriocin st22ch production by *Lactobacillus sakei* st22ch isolated from salpicão, a traditional meat-product from Portugal. *Chemical Engineering Transactions*, Vol. 27, pp. 283 – 288.
- Todorov, S.D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* – production, genetic organization and mode of action. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol.40, pp. 209 – 221.
- Toldrá, F., Nip, W. & Hui, Y.H. (2007). Dry-fermented Sausages: An Overview. In: *Handbook of Meat Processing* (1st ed.), 561 pp., Toldrá, F. (Ed.), Wiley-Blackwell, pp. 321 – 325. (ISBN: 9780813821825).
- Trontel, A., Batusic, A., Gusic, I., Slavica, A.8, Santek, B & Novak, S. (2011). Lactic Acid Production by *Lactobacillus* sp.. *Food Technology and Biotechnology*, Vol.49(nº1), pp. 75 – 82.
- Työppönen, S., Petäjä, E. & Mattila-Sandholm, T. (2003). Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 83, pp. 233-244.
- USDA (1999). *Safe Practices for Sausage Production: Distance Learning Course Manual*. U.S. Department of Agriculture (USDA) & Food Safety and Inspection Service (FSIS). Washington, E.U.A., pp. 96. Disponível em: < <http://www.waltonsinc.com/PDF/SausageFSIS.pdf> >. Acessado em 27 de Setembro de 2013.
- Vidal-Carou, C., Veciana-Nogués, M., Latorre –Moratala, M. & Bover-Cid, S. (2007). Biogenic amines: Risks and control. In: *Handbook of Meat Processing* (1st ed.), 561 pp., Toldrá, F. (Ed.), Wiley-Blackwell, pp. 455 – 468. (ISBN: 9780813821825).
- Vignolo, G. & Fadda, S. (2007). Starter Cultures: Bioproctetive Cultures. In: *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (1st ed.), 576 pp., F. Toldrá (Ed.), Oxford, Blackwell, pp. 147 – 157. (ISBN: 9780813814773).
- Vignolo, G., Fontana, C. & Fadda, S. (2010). Semidry and Dry Fermented Sausages. In: *Handbook of Meat Processing* (1st ed.), 561 pp., Toldrá, F. (Ed.), Wiley-Blackwell, pp. 379 – 398. (ISBN: 9780813821825).
- Warriner, K. & Namvar, A. (2009). What is the hysteria with *Listeria*?. *Trends in Food Science & Technology*, Vol.20, pp. 245 – 254.
- Winkowski, K., Crandall, A.D. & Monteville, T.L. (1993). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beed systems at refrigeration temperatues. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.59(nº8), pp. 2552 – 2557.
- Yeh, K., Chen, S. & Lin, J. (2005). One-year (2003) Nationwide Pork Carcass Microbiolofical Baseline Data Survey in Taiwan. *Journal of Food Protection*, Vol.68(nº3), pp. 458 – 461.
- Yokoyama, E., Maruyama, S. & Katsube, Y. (1998). Production of bacteriocin-like-substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. *Internationa Journal of Food Microbiology*, Vol.40, pp. 133 – 137.
- Yokoyama, E., Shibusawa, Y., Maruyama, S., Katsube, Y. & Mikami, T. (2005). Influence of bacteriocin-like substance, generation times, and enetic profiles of *Listeria innocua* on the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Comparative Immunology Microbiology and Infecctious Diseases*, Vol. 28(nº3), pp. 177 – 186.

- Zacharof, M.P. & Lovitt, R.W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria A Review Article. ICBFS 3rd International Conference on Biotechnology and Food Science (ICBFS 2012). *APCBEE Procedia*, Vol.2, pp. 50 – 56.
- Zaika, L.L. & Kissinger, J. (1981). Inhibitory and stimulatory effects of oregano on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*. *Food Science*, Vol.46, pp. 1205 – 1210.
- Zarei, M., Borujeni, M.P. & Khezzadeh, M. (20012). Comparing the effect of NaCl and KCl on the growth of *Listeria monocytogenes* with a view to NaCl replacement. *Iranian Journal of Veterinary Research*, Shiraz University, Vol.13(nº2), pp, 147 – 151.
- Zeuthen, P. (2007). A historical Perspective of Meat Fermentation. In: *Handbook of Meat Processing* (1st ed.), 561 pp., Toldrá, F. (Ed.), Wiley-Blackwell, pp. 3 – 8. (ISBN: 9780813821825).
- Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E.J. & Ahn, D.U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, Vol.86, pp. 15 – 31.

APÊNDICE A – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO POTENCIAL BACTERIOGÊNICO.

Tabela - Resultados da avaliação qualitativa do potencial bacteriogênico.

	<i>L. plantarum</i> P3B7	dv	<i>L. plantarum</i> P05-15	dv	<i>L. sakei</i> CV3C2	dv
<i>B. thermosphacta</i> (ATCC 11509)	4,40 ^b	0,10	3,73 ^b	0,80	2,28 ^a	1,00
<i>P. aeruginosas</i> (ATCC 27853)	4,73 ^b	0,50	3,98 ^{ab}	0,80	2,28 ^a	0,70
<i>E. avium</i> (EA5)	2,93 ^b	0,20	2,83 ^b	0,80	1,58 ^a	0,10
<i>E. coli</i> (CCUG 42744)	3,95 ^a	1,20	4,13 ^a	0,80	3,38 ^a	0,40
<i>L. innocua</i> (CECT 910)	2,95 ^a	1,00	2,90 ^a	0,80	2,70 ^a	0,40
<i>L. monocytogenes</i> (A41)	3,50 ^b	0,60	3,65 ^b	0,60	2,55 ^a	0,50
<i>L. monocytogenes</i> (AS1)	3,85 ^b	0,60	3,78 ^b	0,60	2,95 ^a	0,30
<i>L. monocytogenes</i> (11S)	4,35 ^b	0,40	4,80 ^b	0,20	3,60 ^a	0,60
<i>L. monocytogenes</i> (131)	4,18 ^a	0,50	4,33 ^a	0,10	3,75 ^a	0,50
<i>L. monocytogenes</i> (18S4)	3,23 ^b	0,10	3,10 ^b	0,10	2,15 ^a	0,30
<i>L. monocytogenes</i> (CECT 934)	2,85 ^b	0,50	2,63 ^b	0,80	1,85 ^a	0,50
<i>S. enteridis</i> (CECT 4300)	4,33 ^b	0,40	4,00 ^b	0,90	2,88 ^a	0,50
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	3,95 ^c	0,30	3,33 ^b	0,80	2,03 ^a	0,50
<i>S. equorum</i> (DSMZ 20029)	4,50 ^b	0,50	3,62 ^a	0,80	2,97 ^a	0,20
<i>S. xylosum</i> (ATCC8166)	4,65 ^a	1,00	3,42 ^a	1,00	2,85 ^a	1,60

Legenda: dv – Desvio padrão. ab – letras diferentes para o mesmo microrganismo correspondem a médias significativamente diferentes.

APÊNDICE B – IMAGENS DAS PLACAS DO MÉTODO ADAPTADO DE SKALKA (1986) PARA A AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BACTERIOGÊNICO DAS ESTIRPES DE LACTOBACILLUS TESTADAS.

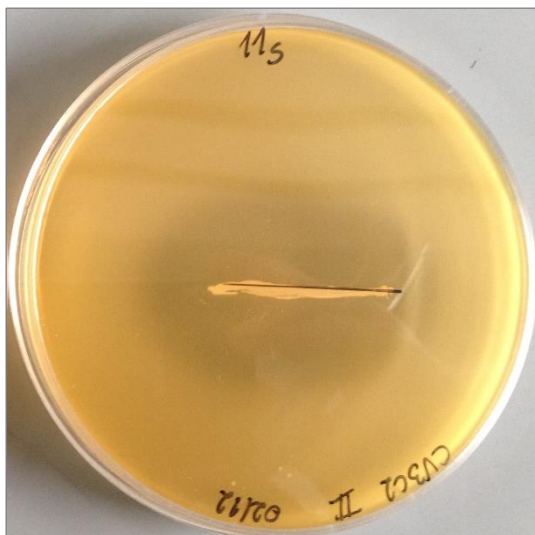


Imagem I – Avaliação qualitativa do potencial bacteriogênico, método adaptado de Skalka (1986). *L. sakei* CV3C2 apresentando halo de inibição para *L. monocytogenes* 11S.



Imagem III – Avaliação qualitativa do potencial bacteriogênico, método adaptado de Skalka (1986). *L. plantum* P3B7 apresentando halo de inibição para *Listeria monocytogenes* CECT 934.

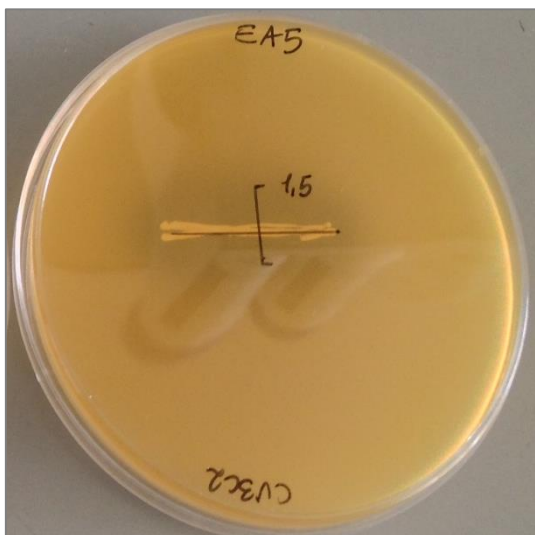


Imagem II – Avaliação qualitativa do potencial bacteriogênico, método adaptado de Skalka (1986). *L. sakei* CV3C2 apresentando halo de inibição para *Enterococcus avium* EA5.

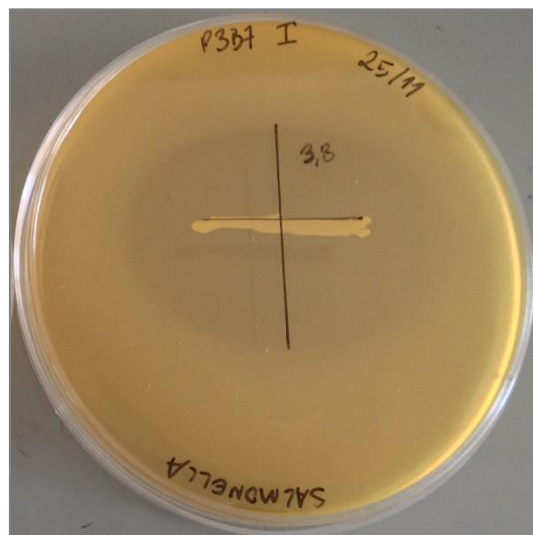


Imagem IV – Avaliação qualitativa do potencial bacteriogênico, método adaptado de Skalka (1986). *L. plantum* P3B7 apresentando halo de inibição para *Salmonella enteridis* CECT 4300.

APÊNDICE C – RESULTADOS DO ENSAIO UTILIZANDO CARNE SEM CONDIMENTAÇÕES.

			Controlo (10)		P3B7 (30)		CV3C2 (40)		P3B7 + CV3C2 (340)		L. innocua (20)		P3B7 + L. innocua (320)		CV3C2 + L. innocua (420)		P3B7 + CV3C2 + L. innocua (3420)		Sig	F
	Tempo (h)	T	Média	dv	Média	dv	Média	dv	Média	dv	Média	dv	Média	dv	Média	dv	Média	dv		
Aeróbios totais a 30°C	0	7 °C	3,25 ^{aA}	0,24	6,31 ^{bA}	0,72	6,18 ^{bA}	0,36	6,10 ^{bA}	0,17	5,88 ^{bA}	0,15	5,51 ^{bA}	0,87	6,56 ^{bA}	0,30	6,25 ^{bA}	0,24	0,000	22,039
	24		3,43 ^{aA}	1,13	6,53 ^{bA}	0,20	6,30 ^{bA}	0,30	6,00 ^{bA}	0,00	6,57 ^{bAB}	0,38	6,20 ^{bAB}	0,34	6,08 ^{bA}	0,18	6,49 ^{bAB}	0,19	0,000	4,969
	48		4,76 ^{aA}	0,40	6,84 ^{bA}	0,15	6,40 ^{abA}	0,34	6,40 ^{abA}	0,34	6,45 ^{abAB}	0,77	6,54 ^{abAB}	0,27	6,59 ^{abA}	1,02	6,30 ^{abAB}	0,60	0,000	6,978
	72	20 °C	7,43 ^{aB}	0,22	8,08 ^{aB}	0,53	7,66 ^{aB}	0,57	7,88 ^{aB}	0,58	8,02 ^{aAB}	0,92	7,47 ^{aB}	0,00	7,82 ^{aAB}	1,18	7,98 ^{aBC}	1,05	0,921	0,396
	96		8,33 ^{aB}	0,63	8,72 ^{aB}	0,26	7,96 ^{aB}	0,65	8,59 ^{aB}	0,21	8,54 ^{aB}	0,46	8,85 ^{aC}	0,12	8,84 ^{aB}	0,21	8,80 ^{aC}	0,14	0,237	1,501
	Sig.		0,000	*	0,000	*	0,002	*	0,000	*	0,011	*	0,000	*	0,017	*	0,003	*	*	*
Pseudomonas	0	7 °C	3,20 ^{abA}	0,50	2,76 ^{aA}	1,66	2,63 ^{aA}	0,70	3,05 ^{aA}	0,92	5,73 ^{cA}	0,36	5,56 ^{bcA}	0,62	5,79 ^{cA}	0,19	5,61 ^{cA}	0,27	0,000	9,651
	24		3,71 ^{aA}	1,13	2,38 ^{aAB}	0,42	1,43 ^{aA}	1,25	2,00 ^{aA}	0,00	5,30 ^{aA}	0,42	4,59 ^{aA}	0,97	4,43 ^{aA}	1,25	4,06 ^{aA}	1,20	0,000	8,190
	48		5,96 ^{aB}	0,57	6,41 ^{aBC}	0,39	6,25 ^{aB}	0,24	6,10 ^{aB}	0,17	6,80 ^{aAB}	0,28	6,35 ^{aA}	0,39	6,20 ^{aA}	0,34	6,58 ^{aA}	0,59	0,001	5,784
	72	20 °C	6,98 ^{aBC}	0,85	8,35 ^{aC}	0,31	8,18 ^{aBC}	0,61	8,00 ^{aC}	0,00	8,12 ^{aBC}	0,46	8,15 ^{aB}	0,63	8,22 ^{aB}	0,54	7,88 ^{aB}	0,84	0,002	5,507
	96		8,47 ^{aC}	0,47	8,96 ^{aC}	0,05	8,80 ^{aC}	0,03	8,69 ^{aC}	0,00	9,28 ^{aC}	0,53	9,08 ^{aB}	0,18	8,62 ^{aB}	0,21	9,00 ^{aB}	0,00	0,002	5,508
	Sig.		0,000	*	0,000	*	0,000	*	0,000	*	0,000	*	0,000	*	0,000	*	0,000	*	*	*
Enterobacteriaceae	0	7 °C	3,36 ^{aAB}	2,15	2,02 ^{aA}	1,52	0,86 ^{aA}	0,80	0,98 ^{aA}	0,97	5,65 ^{aA}	0,49	5,25 ^{aA}	1,28	5,24 ^{aA}	0,62	5,59 ^{aA}	0,11	0,008	4,019
	24		2,15 ^{aA}	0,27	2,35 ^{aA}	0,31	2,10 ^{aAB}	0,17	2,51 ^{aA}	0,07	6,42 ^{bA}	0,59	5,91 ^{bAB}	0,58	5,82 ^{bAB}	0,30	6,16 ^{bA}	0,37	0,000	102,497
	48		3,35 ^{aAB}	0,10	3,44 ^{aA}	0,42	3,30 ^{aB}	0,60	3,05 ^{aAB}	0,39	6,50 ^{bA}	0,70	6,44 ^{bAB}	1,70	5,81 ^{bAB}	0,50	6,23 ^{bA}	0,68	0,000	13,256
	72	20 °C	5,48 ^{aBC}	1,28	6,00 ^{aA}	1,30	5,61 ^{aC}	1,46	4,84 ^{aB}	1,62	8,10 ^{aAB}	1,09	6,65 ^{aAB}	0,91	7,69 ^{aBC}	1,48	7,65 ^{aAB}	1,69	0,145	1,852
	96		7,75 ^{aC}	0,47	7,94 ^{aA}	0,08	8,10 ^{aD}	0,17	8,00 ^{aC}	0,00	9,25 ^{aB}	0,65	8,86 ^{aB}	0,51	8,73 ^{aC}	0,36	9,73 ^{aB}	1,04	0,021	3,350
	Sig.		0,001	*	0,058	*	0,000	*	0,000	*	0,008	*	0,028	*	0,005	*	0,007	*	*	*
Staphylococcus coagulase negativo	0	7 °C	1,86 ^{aA}	0,75	2,43 ^{aA}	0,51	2,47 ^{aAB}	0,41	2,00 ^{aA}	0,00	5,38 ^{aA}	0,12	4,30 ^{aA}	1,47	4,33 ^{aA}	1,42	4,30 ^{aA}	1,21	0,002	5,360
	24		2,58 ^{aA}	0,27	2,38 ^{aA}	0,42	1,43 ^{aA}	1,25	2,00 ^{aA}	0,00	5,30 ^{aA}	0,42	4,59 ^{aA}	0,97	4,43 ^{aA}	1,25	4,06 ^{aA}	1,20	0,000	6,983
	48		2,63 ^{aA}	0,55	2,53 ^{aA}	0,50	2,66 ^{aAB}	0,57	2,66 ^{aA}	0,57	5,95 ^{bA}	0,06	4,59 ^{abA}	0,97	4,46 ^{abA}	1,29	5,25 ^{abA}	0,24	0,000	8,158
	72	20 °C	4,63 ^{aB}	0,65	4,23 ^{aB}	0,68	3,92 ^{aBC}	0,41	4,15 ^{aB}	0,21	8,69 ^{aA}	1,92	6,38 ^{aA}	0,55	5,76 ^{aA}	1,66	5,69 ^{aA}	1,95	0,317	1,295
	96		5,73 ^{aB}	0,73	5,12 ^{aB}	0,72	4,69 ^{aC}	0,27	4,81 ^{aB}	0,20	7,43 ^{aA}	0,75	5,76 ^{aA}	1,32	7,60 ^{aA}	0,00	7,23 ^{aA}	1,07	0,001	6,010
	Sig.		0,000	*	0,000	*	0,001	*	0,000	*	0,270	*	0,279	*	0,113	*	0,133	*	*	*
Microbiota ácido lática	0	7 °C	1,92 ^{aA}	0,41	6,64 ^{bA}	0,18	6,25 ^{bA}	0,24	6,00 ^{bA}	0,00	1,73 ^{aA}	0,36	5,81 ^{bA}	0,84	5,92 ^{bA}	0,41	5,89 ^{bA}	0,08	0,000	86,93
	24		2,20 ^{aAB}	0,72	6,05 ^{bA}	0,17	6,30 ^{bAB}	0,30	6,00 ^{bA}	0,00	1,88 ^{aA}	0,15	6,20 ^{bA}	0,17	5,89 ^{bA}	0,17	5,96 ^{bA}	0,05	0,000	133,140
	48		2,47 ^{aAB}	0,47	6,61 ^{bA}	0,27	6,57 ^{bABC}	0,33	6,23 ^{bA}	0,40	1,69 ^{aA}	0,12	6,10 ^{bA}	0,17	6,35 ^{bAB}	0,10	6,11 ^{bA}	0,42	0,000	131,910
	72	20 °C	4,69 ^{aBC}	1,74	7,56 ^{aB}	0,51	7,56 ^{aBC}	0,75	7,25 ^{aA}	0,91	4,20 ^{aA}	1,41	6,80 ^{aAE}	0,70	7,41 ^{aBC}	0,96	7,33 ^{aA}	1,15	0,008	4,193
	96		5,82 ^{abcC}	0,28	8,15 ^{cB}	0,27	7,66 ^{bcC}	0,57	7,30 ^{abcA}	1,12	5,20 ^{aB}	0,59	7,86 ^{bcE}	0,22	8,15 ^{bcC}	0,21	7,50 ^{abcA}	0,70	0,000	11,317
	Sig.		0,001	*	0,000	*	0,009	*	0,086	*	0,004	*	0,004	*	0,003	*	0,037	*	*	*
Listeria	0	7 °C	0,33 ^{aA}	0,57	0,76 ^{aAB}	1,32	0,00 ^{aA}	0,00	0,00 ^{aA}	0,00	5,38 ^{bA}	0,55	4,82 ^{bA}	0,75	4,76 ^{bA}	0,20	4,93 ^{bA}	0,35	0,000	51,064
	24		0,00 ^{aA}	0,00	0,00 ^{aA}	0,00	0,00 ^{aA}	0,00	0,00 ^{aA}	0,00	5,38 ^{bA}	0,12	5,02 ^{bA}	0,43	5,18 ^{bA}	0,36	5,28 ^{bAB}	0,44	0,000	345,863
	48		0,00 ^{aA}	0,00	0,00 ^{aA}	0,00	0,00 ^{aA}	0,00	0,00 ^{aA}	0,00	5,53 ^{bA}	0,33	5,00 ^{bA}	0,00	6,35 ^{bAB}	0,10	6,11 ^{bAB}	0,42	0,000	1268,563
	72	20 °C	1,00 ^{aA}	1,73	0,10 ^{aAB}	0,19	1,43 ^{aA}	1,66	1,88 ^{aA}	2,67	6,22 ^{aAB}	0,47	5,53 ^{aA}	0,08	6,15 ^{aBC}	0,48	5,89 ^{aBC}	0,17	0,002	5,761
	96		3,82 ^{abcB}	1,11	3,10 ^{aB}	0,17	2,02 ^{aA}	1,84	1,79 ^{aA}	1,55	7,49 ^{dB}	0,50	4,06 ^{cdE}	0,20	6,73 ^{bcdC}	0,36	6,47 ^{bcdC}	0,00	0,000	12,814
	Sig.		0,003	*	0,025	*	0,096	*	0,174	*	0,004	*	0,001	*	0,001	*	0,002	*	*	*

Legenda: T – Temperatura; Letras minúsculas – comparação entre as amostras em relação a cada parâmetro. Letras maiúsculas – comparação entre parâmetros para cada amostra. Teste de Tukey. abcde – letras diferentes para o mesmo dia correspondem a médias significativamente diferentes.

APÊNDICE D – RESULTADOS DO ENSAIO UTILIZANDO MASSA CONDIMENTADA DE CHOURIÇO.

			Controlo (1)		P3B7 (3)		CV3C2 (4)		P3B7 + CV3C2 (34)		<i>L. innocua</i> (2)		P3B7 + <i>L.</i> <i>innocua</i> (32)		CV3C2 + <i>L.</i> <i>innocua</i> (42)		P3B7 + CV3C2 + <i>L.</i> <i>innocua</i> (342)			
	Tempo (h)	T	Média	dv	Média	dv	Média	dv	Média	dv	Média	dv	Média	dv	Média	dv	Média	dv	Sig	F
Aeróbios totais a 30°C	0		2,75 ^{aA}	1,52	6,46 ^{bA}	0,15	5,69 ^{bA}	0,35	6,25 ^{bA}	0,24	5,96 ^{bA}	0,35	6,40 ^{bA}	0,17	6,41 ^{bA}	0,10	6,25 ^{bA}	0,44	0,000	7,609
	24	7 °C	4,17 ^{aAB}	1,57	6,51 ^{aA}	0,72	5,32 ^{aA}	1,25	6,45 ^{aA}	0,21	6,43 ^{aA}	0,22	6,31 ^{aA}	1,24	6,49 ^{aA}	0,19	6,15 ^{aA}	0,27	0,057	2,603
	48		3,15 ^{aAB}	1,03	6,35 ^{bA}	0,39	5,96 ^{bA}	0,85	6,30 ^{bA}	0,30	5,86 ^{bA}	0,75	6,51 ^{bA}	0,07	6,35 ^{bAB}	0,10	6,33 ^{bA}	0,35	0,000	10,803
	72	20 °C	4,72 ^{aAB}	0,26	6,40 ^{bA}	0,17	6,28 ^{bA}	0,61	6,21 ^{bA}	0,41	7,18 ^{bA}	0,65	7,33 ^{bA}	0,57	7,28 ^{bAB}	0,57	7,08 ^{bAB}	0,35	0,000	9,847
	96		7,12 ^{aB}	2,33	6,86 ^{aA}	1,20	7,05 ^{aA}	0,82	6,25 ^{aA}	0,44	7,30 ^{aA}	0,69	7,30 ^{aA}	0,75	7,50 ^{aB}	0,63	7,61 ^{aB}	0,53	0,747	0,600
	Sig.		0,052	*	0,825	*	0,390	*	0,958	*	0,034	*	0,271	*	0,013	*	0,005	*	*	*
<i>Pseudomonas</i>	0		1,15 ^{aA}	2,00	1,20 ^{aA}	2,07	1,23 ^{aA}	2,13	2,49 ^{aA}	2,15	1,86 ^{aA}	3,23	2,20 ^{aA}	2,98	2,75 ^{aA}	3,00	4,92 ^{aA}	1,30	0,608	0,787
	24	7 °C	1,20 ^{aA}	2,07	1,10 ^{aA}	1,90	1,15 ^{aA}	2,00	1,65 ^{aA}	2,33	2,89 ^{aA}	3,54	3,81 ^{aA}	2,26	4,10 ^{aA}	2,02	4,86 ^{aA}	2,27	0,348	1,226
	48		1,15 ^{aA}	2,00	1,23 ^{aA}	2,13	1,20 ^{aA}	2,07	2,48 ^{aA}	2,15	4,41 ^{aA}	2,08	2,76 ^{aA}	3,21	3,92 ^{aA}	1,88	5,20 ^{aA}	1,65	0,243	1,479
	72	20 °C	3,49 ^{aAB}	2,15	2,69 ^{aA}	2,34	2,79 ^{aA}	1,74	2,59 ^{aA}	2,32	4,54 ^{aA}	2,55	4,32 ^{aA}	2,30	4,21 ^{aA}	2,69	5,83 ^{aA}	2,20	0,625	0,746
	96		7,38 ^{aB}	1,96	3,89 ^{aA}	1,95	3,53 ^{aA}	2,90	4,76 ^{aA}	2,63	4,85 ^{aA}	2,80	4,56 ^{aA}	2,84	4,76 ^{aA}	2,63	6,10 ^{aA}	2,94	0,809	0,516
	Sig.		0,040	*	0,431	*	0,576	*	0,877	*	0,701	*	0,798	*	0,882	*	0,932	*	*	*
<i>Enterobacteriaceae</i>	0		0,00 ^{aA}	0,00	0,33 ^{abA}	1,15	0,33 ^{aA}	0,57	1,86 ^{aA}	1,28	5,43 ^{cA}	0,22	5,86 ^{cA}	0,03	5,43 ^{cA}	0,37	5,79 ^{cAB}	0,27	0,000	86,739
	24	7 °C	0,66 ^{aA}	0,57	0,76 ^{aA}	1,32	1,44 ^{aAB}	1,28	1,73 ^{aA}	1,04	6,41 ^{bA}	0,48	5,50 ^{bA}	0,34	5,35 ^{bAB}	0,31	6,06 ^{bAB}	0,80	0,000	26,370
	48		0,33 ^{aA}	0,57	1,10 ^{aAB}	1,15	0,33 ^{aA}	0,57	1,79 ^{aA}	0,61	5,96 ^{bA}	0,35	5,43 ^{bA}	0,51	4,49 ^{bAB}	1,81	5,25 ^{bA}	0,24	0,000	23,161
	72	20 °C	1,20 ^{aA}	1,05	2,92 ^{abAB}	1,67	3,61 ^{abcAB}	1,54	2,71 ^{abA}	0,98	6,49 ^{cdA}	0,19	5,76 ^{bcdA}	1,32	6,63 ^{cdAB}	0,55	6,89 ^{dB}	0,36	0,000	11,944
	96		1,42 ^{aA}	2,01	4,41 ^{abB}	0,92	4,54 ^{abB}	2,08	4,18 ^{abA}	1,14	6,39 ^{bA}	0,65	6,79 ^{bA}	0,19	7,15 ^{bB}	0,27	6,69 ^{bB}	0,53	0,001	7,344
	Sig.		0,421	*	0,018	*	0,009	*	0,032	*	0,054	*	0,165	*	0,026	*	0,013	*	*	*
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	0		3,59 ^{aA}	1,50	3,69 ^{aA}	0,82	3,50 ^{aA}	0,17	3,55 ^{aA}	1,28	5,12 ^{aA}	1,28	5,12 ^{aA}	0,46	5,81 ^{aA}	0,89	4,76 ^{aA}	0,68	0,23	3,305
	24	7 °C	2,91 ^{aA}	0,41	3,59 ^{aA}	0,11	3,81 ^{aA}	0,57	3,30 ^{aA}	0,42	5,02 ^{aA}	1,25	5,15 ^{aAB}	0,40	5,25 ^{aA}	0,93	5,25 ^{aA}	1,40	0,012	3,966
	48		3,65 ^{aA}	0,32	3,35 ^{aA}	0,31	3,63 ^{aA}	0,05	3,46 ^{aA}	0,15	4,66 ^{aA}	0,85	4,33 ^{aAB}	0,57	4,86 ^{aA}	1,71	4,76 ^{aA}	0,40	0,094	2,172
	72	20 °C	4,07 ^{aAB}	0,62	4,06 ^{aA}	0,86	4,47 ^{abcA}	0,52	4,13 ^{abA}	0,51	6,46 ^{cA}	0,62	5,76 ^{abcA}	0,68	6,20 ^{bcA}	1,05	5,77 ^{abcA}	0,83	0,002	5,842
	96		6,00 ^{aAB}	0,00	6,15 ^{aB}	0,27	6,20 ^{aB}	0,34	6,10 ^{aB}	0,17	6,28 ^{aA}	1,05	6,30 ^{aB}	0,60	6,86 ^{aA}	0,80	6,26 ^{aA}	1,57	0,934	0,300
	Sig.		0,025	*	0,001	*	0,000	*	0,000	*	0,208	*	0,015	*	0,290	*	0,405	*	*	*
Microbiota ácido lática	0		1,28 ^{aA}	1,44	6,41 ^{bA}	0,10	6,25 ^{bA}	0,24	6,15 ^{bA}	0,27	0,89 ^{aA}	0,85	6,15 ^{bA}	0,27	6,20 ^{bA}	0,17	6,20 ^{bA}	0,43	0,000	41,952
	24	7 °C	0,98 ^{aA}	0,85	6,02 ^{bA}	0,63	5,59 ^{bA}	1,38	6,23 ^{bA}	0,33	0,33 ^{aA}	0,57	6,00 ^{bA}	0,00	5,41 ^{bA}	0,91	5,99 ^{bA}	0,27	0,000	30,063
	48		1,76 ^{aA}	2,04	5,53 ^{bAB}	0,40	6,35 ^{bA}	0,10	6,10 ^{bA}	0,17	0,53 ^{aA}	0,92	6,10 ^{bA}	0,17	5,53 ^{bA}	1,07	6,35 ^{bA}	0,31	0,000	19,322
	72	20 °C	1,30 ^{aA}	0,30	6,41 ^{bAB}	0,10	6,06 ^{bA}	1,28	6,23 ^{bA}	0,40	1,43 ^{aA}	1,25	6,46 ^{bA}	0,40	6,23 ^{bA}	0,40	6,08 ^{bA}	0,35	0,000	31,310
	96		2,84 ^{abA}	1,20	7,24 ^{cB}	0,57	6,83 ^{cA}	1,20	6,35 ^{bcA}	0,39	2,49 ^{aA}	2,28	6,59 ^{bcA}	0,78	6,25 ^{abcA}	1,99	6,28 ^{abcA}	0,32	0,003	5,452
	Sig.		0,608	*	0,008	*	0,669	*	0,892	*	0,337	*	0,410	*	0,790	*	0,704	*	*	*
<i>Listeria</i>	0		1,82 ^{aB}	1,60	2,25 ^{aA}	1,95	2,39 ^{aA}	2,07	3,10 ^{aA}	3,00	5,51 ^{aA}	0,52	5,53 ^{aA}	0,40	5,10 ^{aA}	0,55	5,00 ^{aA}	0,00	0,000	2,982
	24	7 °C	2,20 ^{aB}	1,92	3,47 ^{abA}	0,00	2,30 ^{abA}	1,99	4,65 ^{abA}	1,90	5,69 ^{bAB}	0,27	4,89 ^{abA}	0,34	5,51 ^{abA}	0,52	5,20 ^{abA}	0,17	0,008	4,390
	48		2,31 ^{aB}	2,00	2,30 ^{aA}	1,99	2,25 ^{aA}	1,95	3,15 ^{aA}	3,01	5,20 ^{aAB}	0,34	4,96 ^{aA}	0,57	5,40 ^{aA}	0,55	4,96 ^{aA}	0,02	0,081	2,288
	72	20 °C	1,98 ^{aB}	1,79	3,16 ^{abcA}	0,51	2,49 ^{abA}	2,17	3,92 ^{abcA}	2,00	6,25 ^{bcAB}	0,76	5,69 ^{abcA}	0,27	6,43 ^{cA}	1,32	5,93 ^{bcAB}	0,65	0,003	5,193
	96		1,88 ^{aB}	2,67	4,34 ^{abA}	0,77	4,66 ^{abA}	0,35	4,66 ^{abA}	1,15	6,65 ^{bA}	0,60	5,73 ^{bA}	1,25	6,91 ^{bA}	0,41	6,61 ^{bB}	0,53	0,001	6,342
	Sig.		0,998	*	0,330	*	0,477	*	0,880	*	0,046	*	0,418	*	0,066	*	0,001	*	*	*

Legenda: T – Temperatura; Letras minúsculas – comparação entre as amostras em relação a cada parâmetro. Letras maiúsculas – comparação entre parâmetros para cada amostra. Teste de Tukey. abcd – letras diferentes para o mesmo dia correspondem a médias significativamente diferentes.

APÊNDICE E – CÁLCULO DOS DIFERENCIAIS DE CRESCIMENTO OBTIDOS PARA CADA PARÂMETRO E TAXA DE CRESCIMENTO CALCULADA PARA CADA PARÂMETRO.

		1	3	4	34	2	32	42	342	10	30	40	340	20	320	420	3420
Aeróbios Totais	0 - 2	0,40	-0,11	0,27	0,05	-0,10	0,11	-0,06	0,08	1,51	0,53	0,22	0,30	0,57	1,03	0,03	0,05
	Δy_{a-b} 2 - 3	1,57	0,05	0,32	-0,09	1,32	0,82	0,93	0,75	2,67	1,24	1,26	1,48	1,57	0,93	1,23	1,68
	0 - 4	4,37	0,40	1,36	0,00	1,34	0,90	1,09	1,36	5,08	2,41	1,78	2,49	2,66	3,34	2,28	2,55
	0 - 48	0,20	-0,06	0,14	0,02	-0,05	0,05	-0,03	0,04	0,76	0,27	0,11	0,15	0,29	0,52	0,02	0,02
	Tx * 48 - 72	1,57	0,05	0,32	-0,09	1,32	0,82	0,93	0,75	2,67	1,24	1,26	1,48	1,57	0,93	1,23	1,68
	0 - 96	1,09	0,10	0,34	0,00	0,34	0,23	0,27	0,34	1,27	0,60	0,45	0,62	0,67	0,84	0,57	0,64
Pseudomonas	0 - 2	0,00	0,03	-0,03	-0,01	2,55	0,56	1,17	0,28	2,76	3,65	3,62	3,05	1,07	0,79	0,41	0,97
	Δy_{a-b} 2 - 3	2,34	1,46	1,59	0,11	0,13	1,56	0,29	0,63	1,02	1,94	1,93	1,90	1,32	1,80	2,02	1,30
	0 - 4	6,23	2,69	2,30	2,27	2,99	2,36	2,01	1,18	5,27	6,20	6,17	5,64	3,55	3,52	2,83	3,39
	0 - 48	0,00	0,02	-0,02	-0,01	1,28	0,28	0,59	0,14	1,38	1,83	1,81	1,53	0,54	0,40	0,21	0,49
	Tx * 48 - 72	2,34	1,46	1,59	0,11	0,13	1,56	0,29	0,63	1,02	1,94	1,93	1,90	1,32	1,80	2,02	1,30
	0 - 96	1,56	0,67	0,58	0,57	0,75	0,59	0,50	0,30	1,32	1,55	1,54	1,41	0,89	0,88	0,71	0,85
Enterobacteriaceae	0 - 2	0,33	0,77	0,00	-0,07	0,53	-0,43	-0,94	-0,54	-0,01	-1,57	2,44	2,07	0,85	1,19	0,57	0,64
	Δy_{a-b} 2 - 3	0,87	1,82	3,28	0,92	0,53	0,33	2,14	1,64	2,13	2,56	2,31	1,79	1,60	0,21	1,88	1,42
	0 - 4	1,42	4,08	4,21	2,32	0,96	0,93	1,72	0,90	4,39	2,93	7,24	7,02	3,60	3,61	3,49	4,14
	0 - 48	0,17	0,39	0,00	-0,04	0,27	-0,22	-0,47	-0,27	0,00	-0,79	1,22	1,04	0,43	0,60	0,29	0,32
	Tx * 48 - 72	0,87	1,82	3,28	0,92	0,53	0,33	2,14	1,64	2,13	2,56	2,31	1,79	1,60	0,21	1,88	1,42
	0 - 96	0,36	1,02	1,05	0,58	0,24	0,23	0,43	0,23	1,10	0,73	1,81	1,76	0,90	0,90	0,87	1,04
Staphylococcus	0 - 2	0,06	-0,34	0,13	-0,09	-0,46	-0,79	-0,95	0,00	0,77	0,10	0,19	0,66	0,57	0,29	0,13	0,95
	Δy_{a-b} 2 - 3	0,42	0,71	0,84	0,67	1,80	1,43	1,34	1,01	2,00	1,70	1,26	1,49	2,74	1,79	1,30	0,44
	0 - 4	2,41	2,46	2,70	2,55	1,16	1,18	1,05	1,50	3,87	2,69	2,22	2,81	2,05	1,46	3,27	2,93
	0 - 48	0,03	-0,17	0,06	-0,04	-0,23	-0,40	-0,48	0,00	0,39	0,05	0,10	0,33	0,29	0,15	0,06	0,48
	Tx * 48 - 72	0,42	0,71	0,84	0,67	1,80	1,43	1,34	1,01	1,00	0,70	0,26	0,49	1,74	0,79	0,30	-0,56
	0 - 96	0,60	0,62	0,68	0,64	0,29	0,30	0,26	0,38	0,97	0,67	0,56	0,70	0,51	0,37	0,82	0,73
LAB	0 - 2	0,48	-0,88	0,10	-0,05	-0,36	-0,05	-0,67	0,15	0,78	-0,03	0,32	0,23	-0,04	0,29	0,43	0,22
	Δy_{a-b} 2 - 3	-0,46	0,88	-0,29	0,13	0,90	0,36	0,70	-0,27	2,22	0,95	0,99	1,02	2,51	0,70	1,06	1,22
	0 - 4	1,56	0,83	0,58	0,20	1,60	0,44	0,05	0,08	4,13	1,51	1,41	1,30	3,47	2,05	2,23	1,61
	0 - 48	0,24	-0,44	0,05	-0,03	-0,18	-0,03	-0,34	0,07	0,39	-0,01	0,16	0,12	-0,02	0,15	0,22	0,11
	Tx * 48 - 72	-0,46	0,88	-0,29	0,13	0,90	0,36	0,70	-0,27	2,22	0,95	0,99	1,02	2,51	0,70	1,06	1,22
	0 - 96	0,39	0,21	0,15	0,05	0,40	0,11	0,01	0,02	1,03	0,38	0,35	0,33	0,87	0,51	0,56	0,40
Listeria	0 - 2	0,49	0,05	-0,14	0,05	-0,31	-0,57	0,30	-0,04	-0,33	-0,76	0,00	0,00	0,15	0,18	1,59	1,18
	Δy_{a-b} 2 - 3	-1,17	-0,05	-1,50	-0,49	0,07	-0,11	-0,24	-0,24	1,00	0,10	1,43	1,88	0,69	0,53	-0,20	-0,22
	0 - 4	0,06	2,09	2,27	1,56	1,14	0,20	1,81	1,61	3,49	2,34	2,02	1,79	2,11	-0,76	1,97	1,54
	0 - 48	0,25	0,02	-0,07	0,02	-0,16	-0,29	0,15	-0,02	-0,17	-0,38	0,00	0,00	0,08	0,09	0,80	0,59
	Tx * 48 - 72	-1,17	-0,05	-1,50	-0,49	0,07	-0,11	-0,24	-0,24	1,00	0,10	1,43	1,88	0,69	0,53	-0,20	-0,22
	0 - 96	0,02	0,52	0,57	0,39	0,29	0,05	0,45	0,40	0,87	0,59	0,51	0,45	0,53	-0,19	0,49	0,39

Códigos e inoculações: *Tx – Taxa de crescimento médio de cada parâmetro ao longo do tempo (horas). Matriz de massa de chouriço – 1: Carne sem inoculações; 2: *L. innocua*; 3: *L. plantarum* P3B7; 4: *L. sakei* CV3C2; 32: *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*; 34: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7; 42 – *L. sakei* CV3C2 + *L. innocua*; 342: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*. Matriz carne sem condimentações – 10: Carne sem inoculações; 20: *L. innocua*; 30: *L. plantarum* P3B7; 40: *L. sakei* CV3C2; 320: *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*; 340: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7; 420 – *L. sakei* CV3C2 + *L. innocua*; 3420: *L. sakei* CV3C2 + *L. plantarum* P3B7 + *L. innocua*.

